

Université de Montréal

DIMINUTION DU CYTOCHROME P450 PAR L'INFLAMMATION :
VOIES DE SIGNALISATION

par
Mihaela Levitchi

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences
en Pharmacologie
DÉCEMBRE 2004

© Mihaela Levitchi, 2004.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures



w

4

U58

2005

v.121

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Ce mémoire intitulé :

**DIMINUTION DU CYTOCHROME P450 PAR L'INFLAMMATION :
VOIES DE SIGNALISATION**

présenté par:

Mihaela Levitchi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Chantal Lambert, Président rapporteur

Patrick du Souich, Directeur de recherche

Maja Krajinovic, Membre du jury

RÉSUMÉ

L'incubation du sérum provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire provoquée par l'injection sous-cutanée de térébenthine et de sérum provenant d'humains ayant une infection virale des voies respiratoires supérieures avec des hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire pendant quatre heures diminue le cytochrome P450 total et l'activité des isoformes CYP1A1/1A2 et CYP3A6, sans toutefois affecter l'expression de ces protéines. Afin d'étudier la voie de signalisation impliquée dans la diminution de l'activité du CYP1A1/1A2 et du CYP3A6, des hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire ont été incubés pendant quatre heures avec du sérum provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire, avec du sérum provenant d'individus ayant une infection virale de voies respiratoires supérieures et avec de l'IL-6 en présence de plusieurs inhibiteurs des protéines kinases. L'inactivation des CYP1A1/1A2 et CYP3A6 induite par les sérums a été partiellement contrecarrée par l'inhibition de la JAK, de la PKR, de la PKC et de la p42/44 MAPK. Le sérum provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire augmente la phosphorylation de Erk1/2. Cet effet est bloqué par le PD98059 tandis que le bisindolylmaleimide, un inhibiteur spécifique de la PKC, n'a pas d'effet. Ces résultats démontrent que la diminution du cytochrome P450 total et de l'activité du CYP1A1/1A2 et du CYP3A6 par les sérums et par l'IL-6 implique l'activation de protéines tyrosine kinase, de la p42/44 MAPK et de la PKC. Des arguments indirects supportent l'implication du monoxyde d'azote dans la diminution de l'activité de ces enzymes.

Mots clés: cytochrome P450, activité, voie de signalisation, inflammation, térébenthine, infection virale.

ABSTRACT

Incubation of serum from rabbits having a turpentine-induced inflammatory reaction and from humans presenting an upper respiratory viral infection with hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction for 4 h reduces total cytochrome P450 content and activity of cytochrome P450 isoforms CYP1A1/1A2 and CYP3A6 without affecting the expression of these proteins. To document the signal transduction pathways implicated in the decrease in CYP1A1/1A2 and CYP3A6 activity, hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction were incubated with serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction, serum from individuals with a viral infection and interleukin-6 for 4 h in presence of inhibitors of protein kinases. The sera-induced decrease in CYP1A1/1A2 and CYP3A6 activity was partially prevented by the inhibition of Janus-associated protein tyrosine kinase, double-stranded RNA-dependent protein kinase, protein kinase C, and p42/44 mitogen-activated protein kinase. The serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction increased the phosphorylation of Erk1/2, effect prevented by PD98059, but not by bisindolylmaleimide, a specific inhibitor of protein kinase C. The results demonstrate that the decrease in total cytochrome P450 content and in CYP1A1/1A2 and CYP3A6 activity by sera and interleukin-6 involves the activation of protein tyrosine kinases, p42/44 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. Indirect evidence supported that nitric oxide is implicated in the decrease in activity of these enzymes.

Key words: cytochrome P450, activity, signal transduction pathways, inflammation, turpentine, viral.

REMERCIEMENT

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au Dr Patrick du Souich pour m'avoir ouvert le monde fascinant de la recherche. Je voudrais lui adresser également mes plus chaleureux remerciements pour son appui inestimable et ses conseils compétents.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Mme Lucie Héroux et Mme Hélène Maurice pour leur excellent support technique. Leur dévouement pour la recherche et leur expérience m'ont été un aide précieux. Je remercie également mes collègues de laboratoire pour leur collaboration ainsi que tous les autres membres du Département de pharmacologie pour l'atmosphère stimulante et enthousiaste.

Je remercie également les membres du jury pour la révision de ce mémoire.

Je suis reconnaissante aux Instituts de recherche en santé du Canada pour leur soutien financier pendant la réalisation de ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT	iii
RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
1. INTRODUCTION	1
1.1 Généralités sur la biotransformation métabolique	1
1.2 Le cytochrome P450	2
1.2.1 Cycle catalytique du cytochrome P450.....	4
1.2.2 Les isoformes du cytochrome P450 impliquées dans le métabolisme des médicaments.....	7
1.2.2.1 La sous-famille du CYP1A.....	7
1.2.2.2 La famille du CYP2	8
1.2.2.3 La famille CYP3	10
1.2.3 Facteurs intervenant dans la régulation de l'expression et de l'activité du cytochrome P450 hépatique	11
1.2.3.1 Âge.....	11
1.2.3.2 Facteurs génétiques.....	11

1.2.3.3	Diète, médicaments et facteurs environnementaux	12
1.2.3.4	Conditions pathologiques	15
1.3	L'effet de l'infection et de l'inflammation sur le cytochrome P450.....	18
1.3.1	Études et observations cliniques	18
1.3.2	Études chez les animaux	20
1.3.3	L'inflammation locale par injection de térébenthine.....	22
1.3.4	L'effet des cytokines et autres médiateurs sur le cytochrome P450 hépatique	24
1.3.4.1	Les cytokines	24
1.3.4.2	Les facteurs hormonaux.....	27
1.4	Mécanismes impliqués dans la régulation du cytochrome P450 lors d'une réaction inflammatoire	28
1.5	Objectif de l'étude	38
2.	PRESENTATION DU MANUSCRIPT.....	40
2.1	Abstract.....	41
2.2	Introduction.....	43
2.3	Materials and Methods.....	45
2.3.1	Hepatocyte isolation and culture conditions	45
2.3.2	Preparation of human serum	46
2.3.3	Signal transduction pathways modulating CYP1A1 and 1A2 activity	47
2.3.4	Signal transduction pathways modulating CYP3A6 activity.....	49
2.3.5	Effect of NO [•] on CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity.....	50
2.3.6	Measure of total cytochrome P450 content and NO [•]	50

2.3.7	Measure of the expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins	51
2.3.8	Immunoblot analysis of Erk1 and Erk2	52
2.3.9	Materials	52
2.3.10	Statistical analysis.....	53
2.4	Results.....	53
2.4.1	Effect of RS _{TIIR} , HS _{URVI} and IL-6 on total cytochrome P450 content and activity.....	53
2.4.2	Signal transduction pathways regulating total cytochrome P450 content, and CYP1A1/1A2 and 3A6 activity.....	57
2.4.3	Effect of protein-kinases inhibitors on NO [•] concentrations in H _{TIIR} and on sodium nitroprusside-induced decrease in cytochrome P450 content.....	63
2.5	Discussion.....	64
2.6	Acknowledgments.....	68
2.7	References.....	69
3.	DISCUSSION ET CONCLUSION	79
3.1	Discussion	79
3.2	Conclusion	89
4.	BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Effect of a turpentine-induced inflammatory reaction (TIIR), serum from rabbits with a TIIR (RS _{TIIR}) and from individuals with an upper respiratory viral infection (HS _{URVI}), interleukin-6 (IL-6) and sodium nitroprussiate (SNP) on total cytochrome P450 content and activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 in hepatocytes from control (H _{CONT}) and rabbits with a TIIR (H _{TIIR}).....	55
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTE DES FIGURES

Introduction - Figure 1: Le cycle du cytochrome P450 dans l'oxydation des médicaments	6
Introduction - Figure 2: Diagramme schématique représentant les voies potentielles de signalisation activées par les cytokines	37
Manuscript :	
Figure 1: Amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{TIIR})....	56
Figure 2: Total cytochrome P450 content of hepatocytes harvested from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction	58
Figure 3: CYP1A1/1A2 activity in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction.....	59
Figure 4: Activity of CYP3A6 in hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction.....	60
Figure 5: Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}) and from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIIR}) on total extracellular signal-related kinase 1/2 (Erk1/2) and on phosphorylated Erk1/2 (ppErk1/2).....	61
Figure 6: Nitric oxide concentration in the supernatant of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and in hepatocytes from rabbits with a turpentine-inflammatory reaction (H_{TIIR}).....	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CYP, l'apoprotéine du cytochrome P450;

DFB, 3,4-difluorobenzyloxy-5,5 diméthyl-4-(4-méthylsulfonyl phényl)-(5H)-furan-2-one;

DFH, 3-hydroxy-4-(4-méthylsulfonyl phényles)-(5H)-furan-2-one;

1,3DMU, acide 1,3-diméthyluric;

Erk1/2, "extracellular signal-related kinase 1/2";

H_{CONT}, hépatocytes provenant de lapins témoins

H_{TIIR}, hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire par l'injection sous-cutanée de térébenthine;

HS_{CONT}, sérum provenant de volontaires sains;

HS_{URVI}, sérum provenant d'humains avec une infection virale des voies respiratoires supérieures;

IFN- γ , interféron- γ ;

IL-, interleukine;

JAK, "Janus-associated protein tyrosine kinase";

L-NAME, N^o-nitro-L-arginine méthyl ester;

p42/44 MAPK, "p42/44 mitogen-activated protein kinase";

MDA malondialdehyde;

1MU, acide 1-méthyluric;

3MX, 3-méthylxanthine;

NO[•], monoxyde d'azote;

NF- κ B, facteur nucléaire- κ B;

NOS, monoxyde d'azote synthase;

PKA, protéine kinase A dépendante du cAMP;

PKC, protéine kinase C;

PKR, "double-stranded RNA-dependent protéine kinase";

PTK, protéine tyrosine kinase;

RS_{CONT}, sérum provenant de lapins témoins;

RS_{TIIR}, sérum provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire par injection sous-cutanée de la térébenthine;

STAT3, "signal transducer and activator of transcription 3";

TNF- α , tumor necrosis factor- α .

1. INTRODUCTION

1.1 Généralités sur la biotransformation métabolique

Les xénobiotiques sont des composés chimiques étrangers au corps humain qui pénètrent dans l'organisme par l'air, la diète, la peau ou par la médication. La biotransformation métabolique est le processus qui rend les xénobiotiques lipophiles plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminables. Elle implique deux types de réactions biochimiques, souvent séquentielles : les réactions oxydatives (Phase I) et les réactions de conjugaison (Phase II).

Les réactions de Phase I sont majoritairement catalysées par le cytochrome P450. Elles incluent l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse. Elles conduisent à l'augmentation de la polarité des molécules par l'introduction d'un groupement fonctionnel réactif. Les métabolites qui en résultent sont le plus souvent inactifs mais dans certains cas, le métabolite peut être actif ou chimiquement réactif et plus toxique que la substance-mère (ex. desméthyl-diazépam, le métabolite actif du diazépam, le N-acetyl-p-benzoquinone imine, le métabolite réactif toxique du paracétamol). Ce groupement fonctionnel sert ensuite de point d'attaque pour les réactions de Phase II.

Les réactions de conjugaison (Phase II) consistent à attacher par voie enzymatique une molécule activée à un groupement fonctionnel d'un médicament ou d'un métabolite généré dans la Phase I. Les plus importantes réactions de Phase II sont: la glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation, la méthylation et la conjugaison avec le glutathion. Le plus souvent les réactions de Phase II génèrent des composés inactifs et hydrosolubles facilement éliminés via l'urine ou la bile (Rang et coll., 1999); il existe toutefois des exceptions comme l'acétylation de la procaïnamide ou la sulfatation du minoxidil qui conduisent à la formation de métabolites actifs.

Le site majeur de la biotransformation est le foie. D'autres tissus impliqués dans le métabolisme des médicaments sont: la muqueuse gastro-intestinale, les reins, les poumons, les gonades, les muscles, le cerveau et la peau.

1.2 Le cytochrome P450

Le cytochrome P450 (P450) est une superfamille d'hémoprotéines localisée au niveau intracellulaire dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse. On le retrouve après homogénéisation et centrifugation différentielle dans la fraction microsomale. Dans certains tissus comme les glandes surrénales, le P450 se trouve aussi dans la fraction mitochondriale. En plus de leur implication majeure dans le métabolisme des xénobiotiques, les enzymes du P450 jouent un rôle critique dans la synthèse et le métabolisme de nombreux composés endogènes (stéroïdogénèse, métabolisme des acides gras et des prostaglandines). Le P450 doit son nom à une propriété spectrale unique : la forme réduite de la protéine lie le monoxyde de carbone pour former un

composé rose qui donne un pic d'absorption à 450 nm. Cette caractéristique est utilisée couramment pour évaluer le contenu total en P450 (Omura T. et Sato R. 1964). Un grand nombre de réactifs (alcools, cétones, détergents) et d'enzymes réagit avec le P450 et produit une hémoprotéine apparentée mais biologiquement inerte, couramment nommée le cytochrome P420. La forme réduite du P420 se combine au monoxyde de carbone donnant une bande d'absorption intense à 420 nm. Outre cette propriété commune, la superfamille du P450 regroupe des enzymes distinctes sur le plan de la séquence en aminoacides, la régulation et la spécificité des réactions catalysées. Les différents P450 ont des substrats spécifiques bien que souvent différentes enzymes puissent catalyser la même réaction avec des cinétiques différentes.

Les avancements de la biologie moléculaire et de la génétique ont permis dernièrement la description de plus de 74 familles de gènes et approximativement 500 isoformes du P450. Le système de nomenclature pour les isoformes du P450 utilise une classification à trois niveaux, basée sur la similitude de la séquence en aminoacides. Les lettres capitales „CYP” sont suivies :

1. D'un chiffre arabe indiquant la famille qui correspond à plus de 40% d'homologie dans la séquence en amino-acides;
2. D'une autre lettre en majuscule désignant la sous-famille qui correspond à plus de 55% d'homologie;
3. D'un un second chiffre arabe désignant les enzymes individuelles dans la sous-famille (ex. CYP1A2).

Le rôle essentiel dans le métabolisme des médicaments chez l'homme revient aux familles CYP1, CYP2 et CYP3; les autres familles ont un rôle physiologique dans le métabolisme des substances endogènes: les acides gras, les acides biliaires et les hormones.

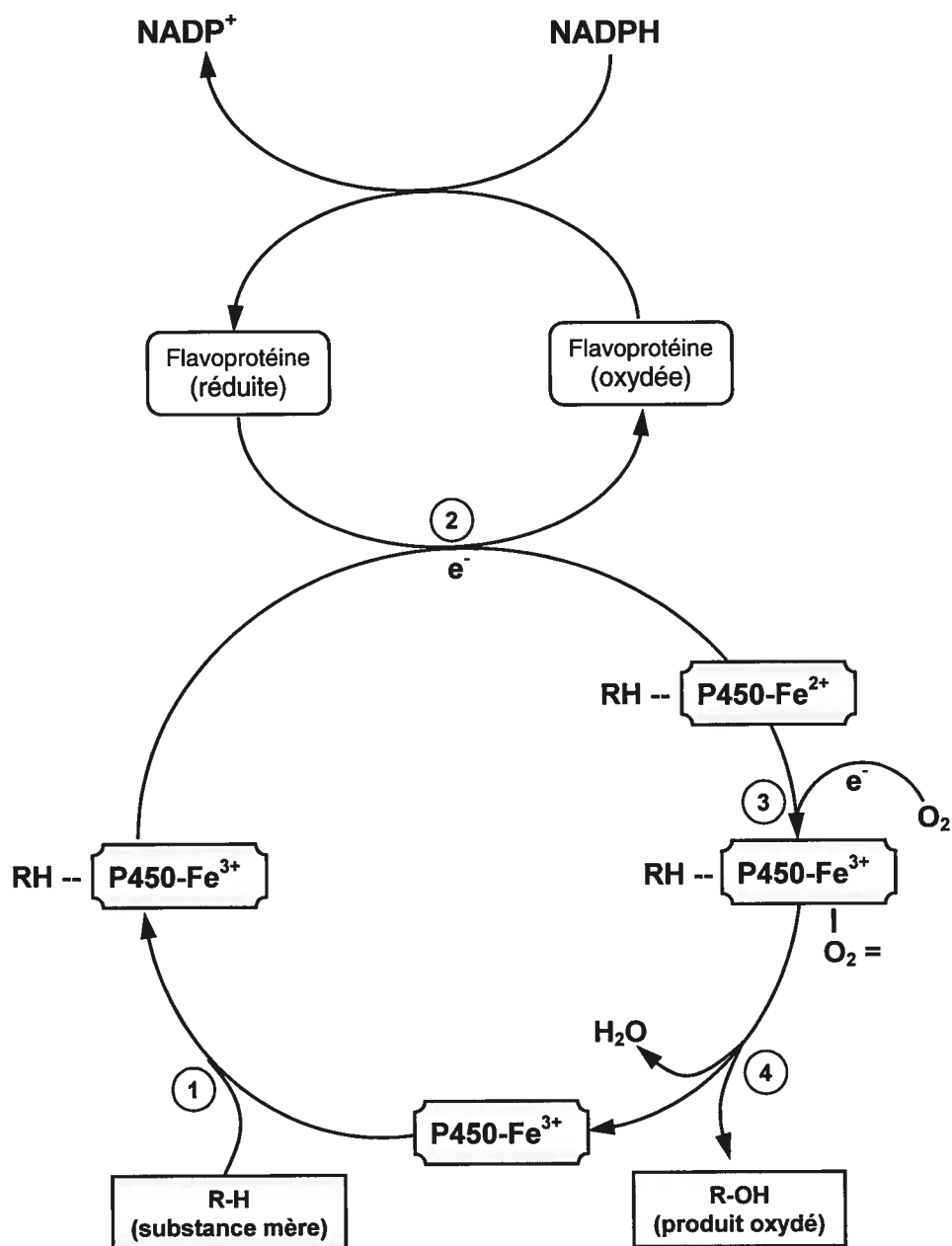
1.2.1 Cycle catalytique du cytochrome P450

Les réactions d'oxydation catalysées par le cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique sont dépendantes de la présence de l'oxygène, du cofacteur NADPH et d'une flavoprotéine, la nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH)-P450-réductase dont la fonction est de transférer un électron du NADPH au complexe substrat-P450. L'ensemble de ces facteurs constitue le système oxydatif mixte. Le cycle de la réaction catalysée par le P450 est schématisé brièvement dans la Figure 1.

1. La liaison du substrat à la forme ferrique du cytochrome conduit à la formation d'un complexe binaire.
2. Le transfert d'un électron du cofacteur NADPH par la NADPH-P450-réductase forme le complexe P450 ferreux-substrat.
3. L'oxygène moléculaire lie ensuite le complexe P450 ferreux-substrat pour former le complexe dioxygène ferreux, qui est réduit après par un deuxième électron provenant de la NADPH-P450-réductase ou NADH-cytochrome b_5 -réductase.
4. Le clivage du lien dioxygène dans le complexe dioxygène ferreux conduit à l'insertion d'un atome d'oxygène au substrat, à la réduction de l'autre atome d'oxygène en eau, à la suppression d'un hydrogène du substrat, à la dissociation du substrat hydroxylé et à la restauration de la forme ferrique de l'hémoprotéine (Ortiz de Montellano, 1986). L'étape limitante des réactions d'oxydation

hépatiques est la réduction du cytochrome P450 car les isoformes du P450 sont présents en large excès par rapport à la cytochrome P450-réductase.

La réaction métabolique comprend aussi des réactions de réduction, d'hydrolyses (le clivage d'un ester ou d'un amide) et des réactions de déalkylation au cours desquelles un alkyle, généralement un méthyle, est libéré de la molécule de médicament et se combine à l'oxygène pour donner un aldéhyde.



Introduction - Figure 1

Le cycle du cytochrome P450 dans l'oxydation des médicaments.

1.2.2 Les isoformes du cytochrome P450 impliquées dans le métabolisme des médicaments

1.2.2.1 La sous-famille du CYP1A

La sous-famille du CYP1A comprend deux membres importants, le CYP1A1 et le CYP1A2. Chez l'homme, le CYP1A1 constitutif est faiblement exprimé dans le foie, étant essentiellement une enzyme extra-hépatique retrouvée dans le poumon et le placenta (Pasanen et Pelkonen, 1994.).

Le CYP1A2 qui représente chez l'homme approximativement 13% du P450 total hépatique est responsable du métabolisme de plusieurs médicaments, comme la théophylline, la caféine, la lidocaïne, le tamoxifen et la warfarine (Katzung, 2001), les deux premiers étant couramment utilisés comme marqueurs de l'activité enzymatique.

Les CYP1A1 et CYP1A2 sont hautement inductibles par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (3-méthylcholanthrène, TCDD) et jouent un rôle important dans la mutagénèse et la carcinogénèse reliées à l'exposition à la fumée de cigarette. On a décrit un polymorphisme génétique dans l'inductibilité du CYP1A1 par les hydrocarbures aromatiques, le phénotype hautement inductible étant plus fréquent chez les patients atteints d'un cancer pulmonaire (Nebert et coll., 1991). Le mécanisme d'induction du CYP1A1, un des mieux déchiffrés présentement, implique le récepteur AhR (Aryl Hydrocarbon), facteur de transcription cytoplasmique qui fonctionne avec le Arnt (Ah Receptor nuclear translocator). Dans les cellules non-traitées, le AhR est localisé dans le cytoplasme lié à hsp90 (Heat Shock Protein). Après la liaison de l'inducteur, AhR se

dissocie de la hsp90, rentre dans le noyau et forme un hétérodimer avec Arnt. L'hétérodimer se lie à une séquence spécifique du gène et active la transcription (Qiang et Whitlock, 1997).

Les CYP1A1 et CYP1A2, purifiés chez plusieurs espèces (rat, lapin, souris) partagent une grande similarité de structure, de sélectivité catalytique et de réponse aux inducteurs.

1.2.2.2 La famille du CYP2

La sous-famille du CYP2A

Parmi les isoformes de cette sous-famille, le rôle le plus important revient chez l'humain au CYP2A6 (approximativement 10% du P450 total), qui catalyse la 7-hydroxylation du coumarin, participe au métabolisme de la nicotine (Nakajima et coll., 1996) et à l'activation mutagénique des N-nitrosamines du tabac. L'expression de cette enzyme chez l'homme est polymorphique (London et coll., 1999). Les isoformes de la sous-famille 2A se caractérisent par une similarité structurelle chez l'homme et les animaux (lapin, rat, souris) mais aussi par des différences notables concernant la spécificité catalytique, qui rendent difficile toute extrapolation des données (Guengerich, 1997).

La sous-famille du CYP2B

Les isoformes appartenant à cette sous-famille, le CYP2B6 chez l'humain, les CYP2B4/5 et les CYP2B1/2 chez le rat, sont quantitativement mineures, difficilement

déTECTABLES dans le foie et ont une contribution faible au métabolisme. Ces enzymes sont induites par le traitement avec le phénobarbital et la cyclophosphamide.

La sous-famille CYP2C

La sous-famille CYP2C est une des plus abondantes au niveau hépatique, et chez l'humain, elle joue un rôle important dans le métabolisme des médicaments. Chez l'homme, il y a au moins quatre isoformes : CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 et CYP2C19. Le CYP2C8 est responsable du métabolisme du taxol et de l'hydroxylation des rétinoïdes, le CYP2C9 métabolise des nombreux médicaments d'usage clinique courant (tolbutamide, (*S*)-warfarine, phénytoïne, losartan, plusieurs anti-inflammatoires non-steroidiens), le CYP2C19 classiquement connu comme la (*S*)-mephenytoïne 4'-hydroxylase, est aussi impliqué dans le métabolisme du propranolol, de l'omeprazol, du diazépâm. Toutes ces enzymes ont une expression polymorphique. Le CYP2C18 joue un rôle mineur intervenant dans le métabolisme des substrats des autres membres de la sous-famille 2C. D'importantes différences d'activité catalytique ont été observées chez le lapin : le CYP2C3 a une activité prédominante testostérone 6 β -hydroxylase et le CYP2C5-progestérone 21-hydroxylase.

La sous-famille CYP2D

La plus connue des enzymes appartenant à cette famille est le CYP2D6, à cause de son rôle dans le polymorphisme de la débrisoquine 4-hydroxylation chez l'homme. D'autres

substrats sont : des agents anti-arythmiques, des anti-dépresseurs tricycliques, des dérivés de morphine, des antipsychotiques et des bloqueurs de récepteurs adrénergiques etc.

La sous-famille CYP2E

Le CYP2E1 catalyse l'oxydation de l'éthanol et d'autres alcools, de certaines alkyles N-nitrosamines, des solvants organiques à faible poids moléculaire jouant un possible rôle dans l'activation métabolique des carcinogènes. Le CYP2E1 conserve une grande similarité de structure et d'activité enzymatique entre les différentes espèces. Il est induit par la consommation chronique de l'éthanol et son activité est inhibée par un usage transitoire.

1.2.2.3 La famille CYP3

Chez l'homme, les enzymes de la famille CYP3A sont les plus importantes pour le métabolisme des médicaments et constituent approximativement 40% du cytochrome P450 total hépatique. Elles sont également exprimées dans l'intestin et le rein. Trois isoformes ont été décrites : CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7. Le CYP3A4 est impliqué dans le métabolisme de plus de 50% des médicaments utilisés (Guengerich, 1997). Dû à sa très large sélectivité catalytique, le CYP3A4 est impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses. Le potentiel d'inhibition ou d'induction de cette enzyme par de nouvelles molécules est une étape importante dans la découverte et le développement d'un nouveau médicament. Parmi les substrats du CYP3A4 on note la testostérone, l'érythromycine, la nifédipine, le midazolam sont utilisés comme marqueurs de l'activité. Les enzymes de la sous-famille 3A sont inductibles par les barbituriques, les

glucocorticoïdes, les macrolides, la phénytoïne et la rifampicine. Chez le lapin, un seul homologue a été décrit, le CYP3A6.

1.2.3 Facteurs intervenant dans la régulation de l'expression et de l'activité du cytochrome P450 hépatique

1.2.3.1 Âge

Les enzymes du cytochrome P450 sont actives dans les premières étapes du développement intra-utérin bien que leur concentration et le nombre d'isoformes soient restreints. Certaines enzymes du P450 sont déficientes chez le fœtus et le prématuré (ex. le CYP1A2 est absent chez le nouveau-né ce qui affecte le métabolisme de la caféine). Le rôle majeur dans le métabolisme des médicaments est détenu par la sous-famille CYP3A, le rapport entre les différents membres de cette famille change pourtant de façon significative: le CYP3A7 prédomine chez le fœtus et le CYP3A4 est la forme majeure chez l'adulte (de Wildt *et coll.*, 1999). Chez les personnes âgées, l'expression diminuée de certaines isoformes du P450 accompagnée de changement d'absorption, de distribution et d'élimination augmente le risque d'effets toxiques des médicaments.

1.2.3.2 Facteurs génétiques

Le sexe

Plusieurs études ont mis en évidence, chez les rongeurs, des différences dans l'expression de certaines isoformes du cytochrome P450 hépatique entre les deux sexes. Elles ont démontré que le rôle déterminant revient au profil temporel de la sécrétion

d'hormone de croissance, hautement pulsatile chez le mâle et plus constant chez la femelle (Wiwi et Waxman, 2004).

Chez les hommes, les CYP1A2 et CYP2E1 semblent plus actifs tandis que chez les femmes le CYP2D6 a une activité augmentée (Meibohm *et coll.*, 2002). L'importance clinique de ces différences n'est pas encore démontrée.

La race et le polymorphisme génétique

L'expression génétique des isoformes du cytochrome P450 est souvent polymorphique (CYP2A6, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) générant un large spectre de phénotypes qui vont du "métaboliseur lent" au "métaboliseur rapide". Plusieurs allèles des gènes du P450 ont été identifiés et leur prévalence varie suivant la race : ainsi 20% de la population asiatique est déficiente en CYP2C19 et 10% de la population caucasienne est déficiente en CYP2D6 (Meyer et Zanger, 1996).

1.2.3.3 Diète, médicaments et facteurs environnementaux

La diète contribue aussi aux variations individuelles observées dans l'activité et l'expression des enzymes du P450. La consommation de crucifères (chou, chou-fleur, brocoli) ainsi que celle d'aliments grillés sur charbon augmentent l'activité des enzymes du CYP1A alors que l'alcool induit le CYP2E1. Le jus de pamplemousse inhibe le CYP3A4 pouvant interférer avec le métabolisme des médicaments co-administrés. L'activité du CYP2E1 est directement influencée par l'état de nutrition. Dans l'étude de O'Shea *et coll.*, (1994), chez des patientes obèses une augmentation de la clorzoxazone

6-hydroxylase (CYP2E1-dépendante) a été notée. Chez les rats, le jeûne prolongé augmente l'activité du CYP2E1 (Iber et coll., 2001).

L'exposition aux diverses substances chimiques (médicaments, polluants environnementaux ou professionnels) peut conduire à l'induction ou l'inhibition du métabolisme dépendant du cytochrome P450. Dans un sens large, l'induction est définie comme une augmentation de l'activité et de la quantité d'enzymes impliquées dans le métabolisme conduisant à une diminution de la durée d'action du médicament. Parmi les facteurs environnementaux, l'exposition à la fumée de cigarette induit les CYP1A1 et CYP1A2 et les pesticides organochlorés induisent le CYP3A4 (Coumoul et coll., 2002). Les anti-épileptiques (phénobarbital, carbamazépine et phénytoïne) et la rifampicine induisent plusieurs isoformes du P450, mais principalement la sous-famille CYP3A. L'inducteur peut agir par plusieurs mécanismes : la stabilisation de la protéine (ex. l'induction de CYP2E1 par l'éthanol) ou de façon plus complexe impliquant des récepteurs intracellulaires, tel le récepteur Ah (Aryl Hydrocarbon Receptor) pour l'induction du CYP1A par les hydrocarbures aromatiques polycycliques, le PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) pour l'induction du CYP4A par le clofibrate, le PXR (Pregnan X Receptor) induit par la rifampicine et le CAR (Constitutive Androstane Receptor) induit par le phénobarbital conduisant à l'augmentation de la synthèse d'enzymes par l'activation de la transcription des gènes des *CYP2B*, *CYP2C* et *CYP3A*.

L'inhibition consiste en la réduction de l'activité du cytochrome P450 causée par la présence simultanée d'une autre substance chimique, ayant pour effet la diminution du métabolisme d'un substrat donné. L'inhibition implique une interaction directe de l'inhibiteur ou de son métabolite avec l'enzyme et se classe selon son mécanisme d'action en : inhibition réversible, quasi-irréversible et irréversible. L'inhibition réversible est transitoire, résultant d'une interaction noncovalente entre l'inhibiteur et l'enzyme. L'inhibition réversible se classe selon les modèles cinétiques classiques de Michaelis-Menten en inhibition compétitive, noncompétitive et uncompetitive. L'inhibition compétitive est un mécanisme où la fixation de l'inhibiteur au site de liaison du cytochrome P450 empêche la fixation du substrat (ex. une seule dose de propafénone diminue de façon importante la biotransformation du métoprolol). L'inhibition uncompetitive se produit lorsque la fixation du substrat à l'enzyme induit un changement de conformation de celle-ci qui révèle le site de fixation de l'inhibiteur. L'inhibiteur noncompétitif ne se lie pas au même site de liaison que le substrat et réagit autant avec l'enzyme qu'avec le complexe enzyme-substrat qui devient inactif. (Segel, 1975). Certaines interactions notamment concernant le CYP3A4 n'obéissent pas aux cinétiques classiques de Michaelis-Menten. Des modèles plus complexes considérant la présence des multiples sites de liaison au site actif du cytochrome P450 ont été proposés pour tenter de décrire ces interactions. (Shou et al. 2001).

L'inhibition quasi-irréversible implique la formation d'un complexe enzyme-métabolite intermédiaire si stable que la restauration de l'activité enzymatique nécessite la synthèse *de novo* de la protéine (ex. la N-déméthylation de l'érythromycine conduit à la formation

d'un complexe stable métabolite-CYP3A4 inhibant ainsi l'oxydation de la cyclosporine et de nombreux autres médicaments). L'inhibition irréversible (inactivation autocatalytique ou suicidaire) se produit lorsque le cytochrome P450 catalyse la conversion du substrat dans un radical intermédiaire réactif qui se lie de façon covalente à l'enzyme, et l'inactive (ex. le 17 α -éthynilestradiol). L'inhibition du cytochrome P450 est responsable d'un grand nombre d'interactions médicamenteuses cliniquement importantes, dont une des plus dramatiques est l'association du ketoconazole ou de l'érythromycine à la térfénadine (Tanaka, 1998).

1.2.3.4 Conditions pathologiques

La présence de maladies peut influencer considérablement l'expression des enzymes du cytochrome P450 et en conséquence, le métabolisme de certains médicaments. Ceci a un intérêt clinique particulier à cause des effets toxiques des médicaments qui peuvent en découler. Les pathologies les plus susceptibles d'interférer avec les réactions métaboliques de phase I ainsi que leurs conséquences sur les isoformes du cytochrome P450 seront brièvement décrites dans les paragraphes qui suivent.

La cirrhose et les maladies hépatiques

Des observations cliniques ont montré une forte corrélation entre la diminution de l'activité des isoformes du cytochrome P450 et la gravité de la maladie hépatique. Les isoformes affectées dépendent du type de la maladie: hépatocellulaire (hépatite virale) ou choléstatique (cirrhose biliaire primitive). Les plus vulnérables sont les CYP1A, CYP2C et CYP3A, les données concernant le CYP2E1 étant contradictoires. George et

ses collaborateurs, ont rapporté en 1995 la diminution de l'ARNm des CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 et CYP2E1 et de leurs protéines chez des patients atteints de maladies hépatiques graves, ce qui suggère que les mécanismes activés agissent au niveau de la transcription.

Les maladies cardio-respiratoires

L'hypoxie, associée aux maladies respiratoires graves (broncho-pneumopathie chronique obstructive, asthme chronique), à l'insuffisance cardiaque congestive ou à l'œdème pulmonaire, entraîne une réduction des réactions de biotransformation dépendantes du cytochrome P450. Des études menées sur des modèles animaux ont montré que l'hypoxie produit une diminution de l'activité et de la quantité des CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 ainsi qu'une augmentation de l'expression du CYP3A6 (Fradette et du Souich, 2004).

L'insuffisance rénale

Des études animales ont mis en évidence que l'insuffisance rénale chronique produit une régulation négative des isoformes spécifiques du cytochrome P450 dans le foie, l'intestin et le rein. Ces résultats supportent des observations cliniques de la diminution de la clairance non-rénale de multiples médicaments chez les patients avec une insuffisance rénale chronique (Pichette et Leblond, 2003).

Le diabète

L'expression des enzymes du cytochrome P450 est contrôlée par des facteurs hormonaux. Le diabète sucré de type II provoque une augmentation de l'activité du CYP2E1 hépatique qui pourrait expliquer les complications hépatiques associées à cette maladie (Wang et coll., 2003).

Une augmentation de la clairance de l'antipyrine et de la caféine a été observée chez des patients souffrant du diabète de type I suggérant une augmentation de l'activité du CYP1A2 (Matzke et coll., 2000).

L'infection et l'inflammation

La capacité du foie à métaboliser des médicaments est modifiée de façon importante par l'infection et l'inflammation. Puisque les mécanismes impliqués dans ce changement constituent l'objet de ce mémoire, l'effet de l'infection et de l'inflammation sur les enzymes du cytochrome P450 sera discuté en détail dans la section suivante.

1.3 L'effet de l'infection et de l'inflammation sur le cytochrome P450

1.3.1 Études et observations cliniques

En 1976, Trenholme et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation des concentrations de la quinine plasmatiques et du ratio de la quinine et de ses métabolites chez des patients traités pour la malaria. Deux ans plus tard, Chang et coll. ont rapporté une augmentation de la demi-vie de la théophylline chez des enfants asthmatiques qui présentaient une infection respiratoire virale. Dans le même contexte, en 1982, Kreamer et coll. rapportaient onze cas de toxicité à la théophylline survenue chez des enfants asthmatiques souffrant d'un processus grippal. Les enfants n'avaient pas d'antécédents d'effets secondaires à des doses standards de théophylline. D'autres études ont montré que la vaccination anti-grippale ou la vaccination anti-tuberculeuse avec le bacille Calmette-Guerin produisent une réduction de l'élimination des médicaments (Morgan, 1997).

En 1997, Shedlofsky et coll. ont confirmé que l'administration de faibles doses d'endotoxine à des volontaires sains produit une réduction importante du métabolisme catalysé par le cytochrome P450. Le degré d'inhibition du P450 est de plus relié avec le niveau plasmatique maximal d'IL-6. Plusieurs médicaments ont été administrés comme marqueurs de l'activité du P450 incluant l'antipyrine, l'hexobarbital et la théophylline. Les isoformes affectées sont le CYP1A2, le CYP2B6, le CYP2C8/9/19, le CYP2E1 et le

CYP3A4. L'effet de l'infection grippale sur la clairance de l'antipyrine a été étudié chez des volontaires, autrement sains, pendant un épisode d'infection respiratoire virale aiguë et comparé avec celui de l'interféron α ou β administré en faibles doses à des patients infectés par le VIH. Les résultats ont confirmé qu'une infection virale aiguë augmente de façon significative les niveaux sériques d'interféron α et γ et diminue l'activité du cytochrome P450 hépatique, évaluée par la diminution de la clairance de l'antipyrine. Dans le même sens, il a été démontré que le traitement avec de faibles doses d'interféron provoque une réduction de l'activité du cytochrome P450 (Brockmeyer et coll., 1998).

Plus récemment, il a été observé chez des enfants avec des infections graves, une diminution de la clairance de l'antipyrine associée à une augmentation des niveaux plasmatiques de l'IL-6 et des nitrites et nitrates (Carcillo et coll., 2003). Chez des patients atteints de cancer, la présence d'une forte réaction inflammatoire aiguë évaluée par le dosage de la protéine réactive C et de l'IL-6, a été associée à une diminution de l'activité du CYP3A4 mesuré par le test respiratoire de l'érythromycine (Rivory et coll., 2002). Ces données montrent que la présence d'une réaction inflammatoire importante expliquerait, par la diminution du métabolisme dépendant du cytochrome P450, la variabilité inter-individuelle des effets thérapeutiques et toxiques de médicaments et suggérerait la nécessité d'une ré-évaluation des doses standards utilisées en clinique.

Abdel-Razzak et coll. (1993) ont montré que des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF- α) agissent directement sur les hépatocytes humains et diminuent l'expression de l'ARNm et l'activité des CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 et CYP3A.

1.3.2 Études chez les animaux

Des nombreuses études expérimentales réalisées avec des animaux ont confirmé la relation cause-effet existant entre une réaction inflammatoire et la réduction du cytochrome P450 hépatique. Ainsi, la péritonite stérile par injection de célite, les modèles expérimentaux d'arthrite avec des adjuvants, comme les mycobactéries inactivées, le traitement avec le vaccin contre la *Bordetella Pertussis* ou l'inducteur d'interféron, le polynucleotide poly(rI.rC.), diminuent certaines réactions métaboliques catalysées par le cytochrome P450 comme la N-déméthylation de la diméthylalanine, la 4-hydroxylation de la cyclophosphamide et l'hydroxylation de la phénytoïne (Arrhenius, 1968; Beck et Whitehouse, 1973; Renton, 1979).

Le métabolisme hépatique a été étudié dans le contexte d'une réaction inflammatoire associée à une infection bactérienne ou parasitaire, à une infection virale et dans de modèles expérimentaux de réaction inflammatoire.

L'injection de l'endotoxine bactérienne (lipopolysaccharide, LPS), un modèle classique d'infection par bactéries gram-négatives, représente le modèle d'inflammation le mieux étudié, produisant une diminution du cytochrome P450 hépatique (Morgan, 1997). Les études entreprises par Renton et ses coll. ont démontré chez la souris qu'une infection bactérienne grampositive (avec *Listeria monocytogenes*) diminue la quantité de cytochrome P450 dans les microsomes et réduit *in vivo* et *in vitro* l'oxydation de

l'aminopyrine et la déméthylation de la théophylline (Azri et Renton, 1987). Le traitement de la souris avec un glycolipide toxique provenant du *Mycobacterium Tuberculosis* diminue la déméthylation de l'aminopyrine et l'hydroxylation de l'aniline (Batra et coll., 1987). Des résultats similaires ont été rapportés par Monshouwer et coll. qui ont noté que l'infection des porcs avec *Actinobacillus Pleuropneumoniae* produit une diminution dramatique de la clairance plasmatique de la caféine et de l'antipyrine.

Les infections parasitaires et leur effet sur le cytochrome P450 hépatique ont aussi fait l'objet de plusieurs études, spécialement avec les agents de la malaria. Ainsi, l'infection de souris avec *Plasmodium Yoelii* diminue de façon significative les activités de l'aniline hydroxylase, de l'aminopyrine-N-déméthylase et de la benzo(a)pyrène hydroxylase (Srivastava et Pandey, 2000). L'infection de moutons avec le *Fasciola hepatica* diminue l'expression du CYP3A et l'activité de l'éthylmorphine-N-déméthylase (Calleja et coll., 2000).

Des observations similaires à celles faites chez des personnes souffrants d'une infection virale respiratoire aiguë, ont indiqué une réduction du métabolisme hépatique associée à d'autres infections virales. Ainsi, Kato et coll. ont montré qu'une infection avec le virus de l'hépatite murine affecte le métabolisme hépatique de l'hexobarbital. Renton rapporte pour sa part en 1981, une diminution de l'activité du cytochrome P450 autour d'une infection avec le virus de l'encéphalomyocardite.

1.3.3 L'inflammation locale par injection de térébenthine

L'injection locale de la térébenthine est un modèle classique d'inflammation aseptique qui déclenche une réponse inflammatoire aiguë. Sur le plan clinique, l'injection sous-cutanée de la térébenthine produit chez l'animal une inflammation au site d'injection accompagnée des symptômes classiques : rougeur, chaleur, "tumeur", douleur, et aussi des symptômes généraux: fièvre, apathie et anorexie aiguës qui atteignent leur apogée 48 h après l'injection. Localement, la réponse inflammatoire est initiée par une variété de molécules informatives ou des médiateurs produits par les mastocytes, les plaquettes, les leucocytes et les terminaisons nerveuses. Certains de ces médiateurs agissent sur les cellules endothéliales produisant une augmentation de la perméabilité capillaire ou une stimulation de l'expression des sélectines, qui assurent l'adhésion initiale des leucocytes à l'endothélium. D'autres médiateurs agissent comme substances chimio-attractives provoquant la migration des leucocytes entre les cellules endothéliales et l'accumulation d'un grand nombre de leucocytes dans le tissu endommagé (Alberts et coll,1994).

La réponse inflammatoire est de plus une réaction systémique faisant suite à une lésion tissulaire et elle se caractérise par des changements dramatiques dans la synthèse de plusieurs protéines secrétées par le foie : les protéines de la phase aiguë. Ces dernières se classifient en deux groupes: les protéines de type I incluant la protéine amyloïde sérique A, la protéine C-réactive, le complément C3, la α_1 -glycoprotéine acide et les protéines de type II, le fibrinogène, la α_1 -antitrypsine, la α_1 -antichymotrypsine et la α_2 -macroglobuline. Le rôle physiologique de ces protéines est de tenter de réduire les effets

systemiques de la lésion tissulaire par l'augmentation de la coagulabilité, la diminution de la protéolyse et l'augmentation de la clairance des métabolites toxiques. Les principaux médiateurs de la réponse inflammatoire sont, premièrement, les cytokines, principalement l'IL-1, l'IL-6 et l'INF- γ , libérées par une variété de cellules : monocytes, macrophages, cellules endothéliales et cellules de Küpffer. Les cytokines sont impliquées dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien et dans l'induction d'eicosanoïdes. La plupart des effets pathophysiologiques de l'IL-1 β et de l'IL-6 sont relayés par les prostaglandines, contrôlés par les autres cytokines et contrecarrés par les glucocorticoïdes (Alberts et coll.1994, Kozak et coll, 1998)

Au cours de la réaction inflammatoire, les systèmes enzymatiques leucocytaires (NADPH oxydase, peroxydase, NO synthase) produisent des substances réactives d'oxygène (SOR), dont l'effet cytotoxique contribue à la défense de l'organisme. Les principales SOR d'origine leucocytaire sont, le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux et le NO \cdot . Cependant, les SOR génèrent également des effets toxiques par l'oxydation des macromolécules (ADN, protéines et lipides) (Morel et Barouki, 1998).

1.3.4 L'effet des cytokines et autres médiateurs sur le cytochrome P450 hépatique

1.3.4.1 Les cytokines

Les effets hépatiques de la réaction inflammatoire se traduisent par l'augmentation de la synthèse des protéines de phase aiguë (α_1 -glycoprotéine et fibrinogène) et la diminution de la synthèse et de la sécrétion d'autres protéines (α_2 -globuline, préalbumine, albumine et α_2 -macroglobuline) (Birch et Schreiber, 1986) et des isoformes du P450. L'IL-6 est considérée comme la cytokine détenant le rôle majeur dans le déclenchement des effets hépatiques de la réaction inflammatoire aseptique. L'IL-1, l'INF- γ et le TNF α agissent sur la production et la libération de l'IL-6.

Siewert et ses collaborateurs, ont rapporté en 2000, que la diminution de l'ARNm codant pour les CYP1A2, CYP2A5 et CYP3A11 survenue au cours d'une réaction inflammatoire suite à l'injection de la térébenthine chez des souris normales, ne se produit pas chez les souris déficientes en IL-6. Par contre, le traitement avec l'endotoxine bactérienne (LPS) produit une réduction de l'ARNm codant pour certaines enzymes du cytochrome P450, autant chez les souris normales que chez les souris déficientes en l'IL-6. Des résultats similaires ont été obtenus par Warren et collaborateurs (1999). Ils ont trouvé que le traitement avec le LPS produit une diminution de la protéine et de l'activité enzymatique du CYP1A, CYP2B, CYP3A et CYP4A, autant chez les souris déficientes en récepteurs pour le TNF- α , que chez les souris de type sauvage. Ces résultats suggèrent que le rôle de l'IL-6 dans la diminution du cytochrome P450 hépatique lors d'une inflammation bactérienne peut être compensé par l'effet de d'autres cytokines.

LLPS injecté pourrait de plus agir directement sur les hépatocytes qui expriment le récepteur du LPS, CD14 (Morgan, 2000).

Le rôle des différentes cytokines dans la régulation négative des enzymes du cytochrome P450 a été confirmé par plusieurs études. Ainsi le traitement de souris avec de l'INF- α humain diminue le cytochrome P450 total (Parkinson et coll., 1982) et l'INF- γ administré par voie intra-péritonéale réduit la quantité de CYP3A hépatique et de la P-glycoprotéine (Kawaguchi et coll., 2004). L'INF- γ administré chez des rats à des doses immunostimulantes diminue les activités de l'étoxyrésorufin *O*-dééthylase et de la penthoxyresorufin-*O*-dééthylase (Moritz et coll., 1998).

L'IL-1 β administré *in vivo* chez des rats produit une diminution des CYP2C6, 2C13, 2E1, et 3A2 sans affecter le CYP2A, 2B1/2, 2C11, et 4A1 (Kudo et Kawano, 1999). Le traitement de rats avec le TNF- α diminue les protéines et l'ARNm codant pour le CYP2C11 et le CYP3A2, ainsi que les activités enzymatiques associées, mais il n'affecte pas les CYP2A1 et CYP2C6 (Nadin et coll., 1995).

Le traitement intraveineux de rats avec de fortes doses d'IL-6 humain recombiné, réduit l'activité de l'éthylmorphine-*N*-déméthylase, de l'éthoxycoumarin-*O*-dééthylase et de l'éthoxyrésorufin-*O*-dééthylase sans toutefois modifier l'activité du pentoxyresorufin-*O*-dééthylase, dépendante principalement du CYP2B1 (Chen et coll., 1992). En plus des cytokines mentionnées précédemment, l'IL-2 administrée chez des rats diminue plusieurs

isoformes du cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2D1 et CYP3A) et les activités enzymatiques dépendantes (aminopyrine N-deméthylase, éthoxycoumarin O-deéthylase, benzo(a)pyrène hydroxylase, éthoxyrésorufin O-deéthylase, pentoxyrésorufin O-déalkylase et l'érythromycine N-deméthylase).

Pour déceler l'effet direct des interférons α/β et leurs effets sur la libération des autres cytokines, notamment l'IL-6, des études ont été réalisées *in vitro*. Ainsi, l'INF- γ diminue les ARNm et les protéines des CYP3A1/2 ainsi que la testostérone 6 β -hydroxylase dans des hépatocytes témoins ou induits par le phénobarbital, alors qu'il ne produit pas d'effet sur le niveau d'ARNm ou de la protéine du CYP2C11 constitutif (Tapner et coll., 1996). Abdel-Razzak et coll. (1993), ont comparé l'effet de plusieurs cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α et INF- γ) sur l'expression des CYP1A2, CYP2C, CYP2E1, CYP3A et de l'époxyde hydrolase, ainsi que sur la déethylation de l'éthoxyrésorufin et l'oxydation de la nifédipine dans des cultures primaires d'hépatocytes humains. L'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α ont produit une forte diminution des ARNm et des activités enzymatiques de toutes les isoformes étudiées. Par contre, l'INF- γ diminue seulement les ARNm des CYP1A2 et CYP2E1, ainsi que l'activité de l'éthoxyrésorufin-O-deéthylase sans affecter l'ARNm codant pour le CYP3A. D'autres études *in vitro* ont comparé l'effet de l'IL-1 β , l'IL-2 et l'INF- γ sur l'expression et l'activité des CYP1A1/2 et CYP3A6 constitutifs et induits dans les hépatocytes de lapin (Calleja et coll, 1997 ; Calleja et coll., 1998). Les résultats ont montré que l'IL-1 β et l'IL-2 ont un fort effet suppresseur sur les ARNm

codants pour les CYP1A1/2 et CYP3A6. L'INF- γ réduit dramatiquement les activités enzymatiques associées aux CYP1A1/2 et CYP3A6 et le niveau de ces protéines, sans affecter significativement leurs ARNm. Ces études suggèrent que l'IL-1 β et l'IL-2 activent des mécanismes au niveau de la transcription tandis que l'INF- γ agit au niveau post-transcriptionnel.

1.3.4.2 Les facteurs hormonaux

La complexité de la réponse inflammatoire *in vivo* inclue d'autres facteurs qui affectent l'expression des enzymes du cytochrome P450. Ainsi, la réaction inflammatoire modifie le niveau sérique de plusieurs hormones; les glucocorticoïdes, l'épinéphrine et le glucagon qui sont potentiellement impliqués dans la diminution du cytochrome P450. L'injection de faibles doses de dexaméthasone chez des rats diminue l'expression du CYP2C11 et du CYP3A2. Les glucocorticoïdes interviennent d'une manière complexe dans la régulation du cytochrome P450. À des faibles doses ils induisent l'ARNm du *CYP2C11* alors qu'à des doses fortes, équivalentes à celles observées lors de situations de stress, ils ont un effet suppresseur. La sécrétion de glucagon et d'épinéphrine ainsi que leurs niveaux plasmatiques sont augmentés lors d'une réaction inflammatoire. *In vitro*, l'incubation d'hépatocytes de rat avec le glucagon ou l'épinéphrine pendant 24 h active la voie de l'cAMP et produit une diminution de l'ARNm du *CYP2C11*, indiquant un possible rôle de ces hormones dans la diminution du cytochrome P450 hépatique par l'inflammation (Morgan, 2001).

Un autre effet de l'inflammation est l'activation de la phospholipase A2. Ceci conduit à l'augmentation de la production d'écossanoïdes biologiquement actifs, dont le rôle dans la diminution du cytochrome P450 hépatique n'est pas encore bien défini.

1.4 Mécanismes impliqués dans la régulation du cytochrome P450 lors d'une réaction inflammatoire

La diminution des isoformes du cytochrome P450 dans le foie ou dans des hépatocytes en culture, associée à une réaction inflammatoire ou à l'administration de cytokines ou d'interférons, a été souvent attribuée à une diminution de la transcription des gènes du cytochrome P450, mais d'autres mécanismes sont possiblement impliqués: comme la dégradation de l'ARNm ou de la protéine et l'inactivation de l'enzyme. La diversité des mécanismes impliqués est soulignée par l'observation que dépendamment du stimulus inflammatoire ou du type de réaction inflammatoire étudiée, certaines isoformes du cytochrome P450 sont diminuées, d'autres sont induites et d'autres ne sont pas affectées.

Le rôle des cytokines dans la modulation de l'expression des isoformes du cytochrome P450 est bien établi, mais les voies de signalisation activées demeurent cependant peu connues. Les cytokines se lient à leurs récepteurs et elles initient une cascade de signalisation conduisant à l'activation/stabilisation de facteurs de transcription, qui se lient à des séquences spécifiques dans la région promoteur des gènes cibles et modulent leur transcription. Ceci peut conduire à une diminution de l'expression de récepteurs nucléaires ou/ et d'isoformes du cytochrome P450 (Introduction-Figure 2).

Ainsi, le récepteur de l'IL-6 est une protéine membranaire de type I (un domaine transmembranaire et la partie N-terminal extracellulaire), appartenant à la famille des récepteurs de cytokines de classe I. Ce récepteur est défini par la présence d'une chaîne α , le „module de liaison” de l'IL-6 et d'une chaîne β le „capteur de signal”, le gp-130. La chaîne α est associée à une *Janus kinase* (Jak1, Jak2 ou Tyk2). La liaison de l'IL-6 induit l'homodimérisation du gp-130 et ensuite, l'activation de la Jak. La Jak activée phosphoryle des résidus tyrosine spécifiques sur le gp-130 qui fixent les domaines SH2 des facteurs de transcription „STAT” (Signal Transducer and Activator Transcription Factor), STAT3 et STAT1. Les Jak vont phosphoryler des résidus tyrosine dans la proximité du segment C-terminal des facteurs STAT. Les STATs phosphorylés forment des dimers et sont transloqués dans le noyau. Cette translocation est rapide et transitoire (observé par immunofluorescence). Quelques minutes après le traitement des cellules avec l'IL-6, le STAT1 et STAT3 sont retrouvés préférentiellement dans le noyau, l'effet disparaissant deux heures après le traitement. Dans le noyau, le STAT dimerisé se lie à une séquence spécifique de l'ADN dans la région régulatrice des gènes spécifiques, et il stimule, ou dans certains cas, il réprime la transcription. Parmi les gènes activés par le STAT, on retrouve les gènes de la réponse inflammatoire (la protéine réactive C, l' α_1 -antichymotrypsin et l' α_2 -macroglobulin), les facteurs de transcription Jun B et c-Fos, la „Heat-Shock Protein” hsp90 et le gp-130. Les sites de liaison des STATs se trouvent souvent à proximité des sites de liaison d'autres facteurs de transcription (ex. le STAT3 en proximité de NF- κ B et l'Activator Protein AP-1) suggérant que plusieurs facteurs de

transcription modulent ensemble la transcription de certains gènes (Heinrich et coll., 1998).

La régulation de la voie du gp130/Jak/STAT est complexe et elle implique la déphosphorylation, la dégradation protéolytique, la participation des protéines suppressives de la signalisation des cytokines et l'endocytose du complexe IL-6-récepteur. Des formes solubles de récepteurs des cytokines ont été trouvées dans le plasma et leur rôle serait de moduler les effets cellulaires et systémiques des cytokines. L'injection d'IL-6 marqué au ^{125}I montre que sa demi-vie plasmatique est d'environ deux minutes. L'IL-6 s'accumule dans le foie, les hépatocytes étant non seulement le site de régulation des gènes de la réaction inflammatoire aiguë, mais également le principal site d'élimination de l'IL-6. (Heinrich et coll., 1998).

Le gp 130 phosphorylé lie également la tyrosine phosphatase SHP2. La SHP2 est impliquée dans l'activation de la cascade Ras/Raf/Erk, suite à une stimulation par l'IL-6. La partie C-terminale du SHP2 phosphorylé sur des résidus tyrosine recrute le complexe Grb2/mSOS. mSOS active la cascade Ras/Raf/Erk. Le SHP2 phosphorylé se lie à la protéine adaptatrice Gab1 qui permet alors l'activation de la voie du phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3-kinase) (Heinrich et coll., 1998). La Gab1 relie de plus le récepteur gp130 à la voie Erk/MAPK (Takahashi-Tezuka et coll., 1998).

Le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 ainsi qu'un grand nombre de pathogènes (substances microbiennes : LPS, peptidoglycans, lipoprotéines, l'ADN bactérien et le double brin d'ARN viral)

activent la voie du NF- κ B, une autre cascade de signalisation impliquée dans l'induction des mécanismes de défense comme l'activation du complément, l'expression des gènes des peptides antimicrobiens et l'activation de la phagocytose. La liaison du TNF α à son récepteur TNFR1 produit un changement conformationnel qui permet le recrutement de plusieurs protéines: TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain Protein), RIP (Receptor-Interacting Protein) et TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2). Le NF- κ B réside dans le cytoplasme lié de façon covalente à un inhibiteur, l'I κ B. Le TRAF2 active l'I κ B kinase (IKK). L'IKK phosphoryle l'I κ B qui est dégradé par la voie de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine. L'IL-1 et le LPS activent l'IKK, libérant ainsi le NF- κ B, selon un mécanisme similaire, par l'activation d'une cascade de protéines (MyD88, IL-1 Receptor Associated Kinase et TRAF6). Le NF- κ B ainsi libéré est transloqué dans le noyau où il agit comme facteur de transcription se liant à des séquences spécifiques sur un grand nombre de gènes. L'effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est relayé par l'augmentation de la production d'I κ B (Silverman et Maniatis, 2001). Des découvertes récentes ont montré que l'IL-1 active en plus trois autres cascades de protéines kinases : la p44/42 MAPK, la p38 et le "Stress-Activated Protein Kinase"/JNK (Chen et coll., 2000).

La complexité des mécanismes mis en jeu est mise en évidence par la découverte d'autres voies conduisant à l'activation du NF- κ B qui impliquent le recrutement du phosphatidylinositol-3 kinase au domaine cytoplasmique du récepteur IL-1 (Auron, 1998) et par l'interaction existant entre le NF- κ B activé par l'IL-1 et le STAT3 activé par

l'IL-6. L'étude réalisée par Tian et coll. (1999), rapporte que l'activation du NF- κ B conduit à une interaction physique et une inhibition fonctionnelle réciproque entre le l'Ahr et le NF- κ B. La diminution de l'Ahr, dont le rôle dans la régulation de l'expression des CYP1A1/2 est présenté dans la section 1.2.2.1, par le NF- κ B pourrait expliquer la suppression des CYP1A1/2 par les cytokines. La régulation négative du CYP2C11 par l'IL-1 β est relayée par la liaison du NF- κ B aux éléments de réponse négative NF- κ B 1 du gène *CYP2C11* (Iber et coll., 2000). Cheng et coll. (2003) ont rapporté que la transcription des gènes du CYP2C11, CYP3A2 et CYP2E1 est réduite dans le foie de rat une à deux heures après l'injection de LPS et que la liaison des facteurs nucléaires hépatocytaires (HNF1 α , HNF3 β , et HNF4 α) à l'ADN est diminuée. Le curcumin, un inhibiteur de l'activation du facteur NF- κ B, inhibe la suppression de la transcription du CYP2E1 et du CYP3A2, sans toutefois affecter l'induction des autres gènes contrôlés par le NF- κ B.

Ke et coll., 2001, ont étudié le rôle du NF- κ B dans la suppression de l'expression du gène du CYP1A1 par le TNF α et le LPS. Leurs résultats ont montré l'effet d'inhibition réciproque des voies de signalisation du NF- κ B et de l'Ahr et le rôle direct du NF- κ B dans l'effet suppresseur du LPS et du TNF α sur le *CYP1A1*. De nombreux facteurs affectent la formation et l'activité de l'hétérodimère de l'AP-1 (Activator Protein-1, formé de c-fos et c-jun) par la modulation de la phosphorylation du complexe formé ou par la modulation de l'interaction protéinique. Le facteur NF- κ B interagit avec l'AP-1 résultant

en une augmentation synergique des activités. Abdel-Razzak et collaborateurs (1994) ont montré que le TGF- β 1 produit une régulation négative du CYP1A1/2 constitutif et induit par des hydrocarbures aromatiques polycycliques accompagnée d'une augmentation de l'activité de l'AP-1. Ceci indique une possible participation des produits des proto-oncogènes fos et jun dans cet effet. L'action du TGF- β 1 sur le CYP1A1/2 a été bloquée par la cycloheximide suggérant qu'une synthèse protéique est nécessaire pour que l'effet du TGF- β 1 soit présent. Warren et collaborateurs (1999) ont trouvé que le traitement avec le LPS produit chez le rat une diminution de l'ARNm du *CYP3A2*, une diminution de la protéine du CYP3A2 et du cytochrome P450 total et que ces changements impliquent une augmentation de l'activité de l'AP-1 et du facteur nucléaire de l'IL-6.

D'autres observations suggèrent que la diminution de certaines isoformes du cytochrome P450 par l'inflammation implique des membres de la famille des récepteurs nucléaires : PXR (Pregnane X Receptor), CAR, (Constitutive Activated Receptor), RXR (Retinoid X Receptor), PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) et HNF-4, (Hepatocytes Nuclear Factor-4). L'IL-6 diminue l'expression de l'ARNm du *PXR* et du *CAR* dans des hépatocytes humains en culture conduisant à la diminution de l'effet inducteur de la rifampicine et du phénobarbital sur les CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 et CYP3A4 (Pascussi et coll., 2000). L'étude du profil de l'induction du cytochrome P450 par le phénobarbital chez des souris déficientes en récepteurs du TNF α (p55/p75) a confirmé ces résultats en observant que le TNF α endogène module *in vivo* l'induction du CYP2B et du CYP3A par l'inhibition de l'accumulation du CAR dans le noyau (Van Ess

et coll., 2002). Le LPS et le clofibrate produisent une diminution de l'ARNm du CYP2A5, du CYP2C29 et du CYP3A11 hépatiques chez la souris et ces effets sont atténués ou absents chez la souris déficiente en PPAR α (Peroxisomes Proliferator Activated Receptor α) (Barclay et coll., 1999) suggérant l'implication de ce récepteur nucléaire dans la régulation négative du cytochrome P450 par l'inflammation.

D'autres composantes de la voie de signalisation du NF- κ B sont les protéines kinase C atypiques, λ et ζ et l'inhibition de ces enzymes reduisent également la voie de signalisation activée par l'IL-1 et le TNF α (Blackwell et Christman, 1997).

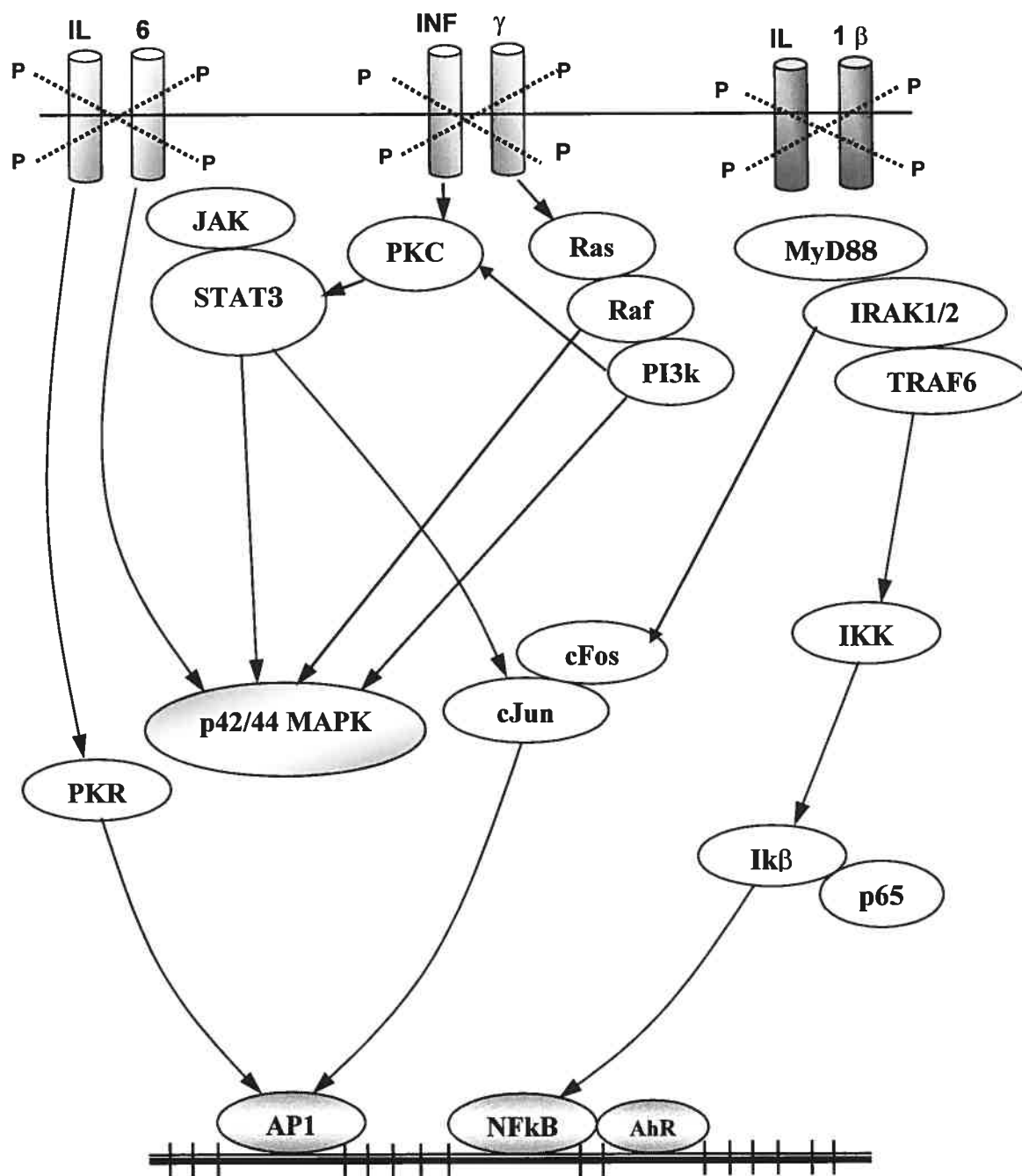
La liaison des interférons (INF) α/β et γ à leurs récepteurs active les voies de la p42/44 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et des Jak-STAT dans des hépatocytes et module ainsi la transcription des gènes cibles. (Nguyen et coll., 2000). L'INF- γ active également le NF- κ B, indépendamment du TNF α , par un mécanisme dépendant de l'activation du PKR (ARN Dependent Protein Kinase), une protéine de réponse au stress qui a un rôle important dans la défense anti-virale. La PKR a une distribution ubiquitaire et un puissant effet inhibiteur de la synthèse de protéines (Deb et coll., 2001).

Les substances réactives de l'oxygène (SOR) et le monoxyde d'azote (NO) ont été souvent associés à la diminution ou à l'inactivation du cytochrome P450 hépatique par l'inflammation autant *in vivo* (Proulx et du Souich, 1995) qu'*in vitro* (El-Kadi et coll., 2000). Au cours d'une réaction inflammatoire les SOR sont produites par les systèmes

enzymatiques leukocytaires ou elles proviennent des fuites électroniques du cycle catalytique du cytochrome P450 lui-même. Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde libérés dans les cellules génèrent, en présence d'ions de fer, le radical hydroxyle hautement réactif. Les SOR ainsi libérés perturbent l'homéostasie redox de la cellule induisant un stress oxydatif et produisent des altérations structurelles des macromolécules (ADN, protéines, lipides). Les SOR agissent également directement ou par l'intermédiaire de produits résultant de la peroxidation des lipides (acroléine, F2-isoprostane) comme molécules de signalisation modulant l'activité des „stress kinases” (JNK, ERK, p38) ou de certains facteurs de transcription comme le NF- κ B et IAP-1, le SP1, le récepteur de glucocorticoïde et le NFI (Nuclear Factor 1) (Morel et Barouki, 1998).

Les cytokines (TNF α , INF- γ et IL-1 β) augmentent l'activité de la sphingomyélinase, une forme spécifique de la phospholipase C (PLC), conduisant à l'augmentation de la production de céramide. Le céramide agit dans la cellule comme second messager étant impliqué dans la modulation de la phosphorylation, de l'activité des protéines kinases, du facteur NF- κ B, des proto-oncogènes c-myc et c-jun, de la phospholipase A et dans la libération de prostaglandines (Hannun, 1994). Merrill et collaborateurs (1999) ont rapporté que l'IL-1 β diminue le CYP2C11 dans des hépatocytes de rat et que cette réponse implique l'hydrolyse de la sphingomyéline à la céramide et de la céramide à la sphingosine, ainsi que la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate.

L'activité de certaines isoformes du cytochrome P450 est rapidement contrôlée par phosphorylation. Ce mécanisme affecte spécialement les isoformes CYP2B1/2 et CYP2E1 qui sont phosphorylées par la protéine kinase A (PKA). L'enzyme phosphorylée est complètement inactive (Oesch-Bartlomowicz et Oesch, 2003). Le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{INF-}\gamma$ et l'IL-1 activent la phospholipase C, augmentent l'hydrolyse de la phosphatidylcholine et la production de diacylglycérol (DAG). Le DAG agit comme second messenger et il active la PKC (Schitze et coll., 1991). Cette observation a été confirmée par l'étude de Moritz et collaborateurs (1998) qui ont observé que la diminution des activités de la pentoxyrésorufin-O-dééthylase et de l'éthoxyrésorufin-O-dééthylase chez les rats traités avec $\text{INF-}\gamma$ ou de la streptolysine-O est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la protéine kinase C (PKC) suggérant un rôle potentiel de la PKC dans la voie de signalisation activée par l'inflammation conduisant à la diminution du cytochrome P450 hépatique.



Introduction - Figure 2

Diagramme schématique présentant les voies potentielles de signalisation activées par les cytokines.

1.5 Objectif de l'étude

La réaction inflammatoire aiguë causée par l'injection sous-cutanée de térébenthine entraîne *in vivo* une diminution du cytochrome P450 total hépatique (Kobusch et coll., 1986; Mahu et Feldmann, 1984). Quarante-huit heures après l'induction de la réaction inflammatoire, on observe une régulation négative des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 (El-Kadi, 2000) qui est précédée par une diminution de l'activité de ces mêmes isoformes (Bakarat, 2001).

In vitro, il a été démontré que le sérum provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire aiguë (RIA) suite à l'injection sous-cutanée de térébenthine (RS_{TIR}) et le sérum provenant d'humains ayant une infection virale aiguë des voies respiratoires supérieures (HS_{URVI}) contiennent des médiateurs qui produisent une diminution du cytochrome P450 total et de l'activité des CYP1A1 et CYP1A2, lorsqu'ils sont incubés pendant quatre heures dans une culture d'hépatocytes provenant de lapins ayant une RIA (H_{TIR}) (El-Kadi et coll., 1997) sans affecter le niveau des protéines du CYP1A1/2. Cette diminution est associée à une augmentation de la peroxydation des lipides (Proulx et du Souich, 1986, El-Kadi et coll., 1997) suggérant l'implication de SOR.

In vivo, le traitement de lapins présentant une RIA avec le N-nitro-L-arginine-méthyl ester (L-NAME) pendant 72 heures prévient partiellement la diminution de la clairance de la théophylline et du cytochrome P450 total. Le L-NAME n'influence pourtant pas la régulation négative des CYP1A1 et CYP1A2 hépatiques, ni la capacité du sérum RS_{TIR}

de diminuer l'activité du cytochrome P450 dans une culture d'hépatocytes H_{TIR} (Bakarat, 2001). *In vitro*, l'incubation des H_{TIR} , en présence du L-NAME ou des antioxydants (diméthylthiourea et N-acétylcystéine) avec des RS_{TIR} et des HS_{URVI} prévient, seulement partiellement, la diminution de l'activité du cytochrome P450, indiquant que, , d'autres mécanismes sont possiblement également activés par des médiateurs sériques (El-Kadi, 2000).

L'incubation des RS_{TIR} et HS_{URVI} pendant quatre heures avec des hépatocytes provenant de lapins témoins n'affecte pas le niveau du cytochrome P450 total ni l'activité des CYP1A1/2 dans ces hépatocytes.

La diminution de l'activité du cytochrome P450 par le RS_{TIR} est presque totalement dépendante de l'IL-6, alors que dans le HS_{URVI} , l'INF- γ , l'IL-1 β et l'IL-6 contribuent à la diminution de l'activité du cytochrome P450 (Bleau et coll., 2000).

Le but de cette étude était de tenter d'identifier des voies de signalisation activées par les RS_{TIR} , les HS_{URVI} et l'IL-6 conduisant à la diminution du cytochrome P450 total et à la diminution de l'activité du CYP1A1, du CYP1A2 et du CYP3A6 dans des hépatocytes provenant de lapins ayant une RIA.

2. PRESENTATION DU MANUSCRIPT

SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IMPLICATED IN THE DECREASE IN CYP1A1, 1A2 AND 3A6 ACTIVITY PRODUCED BY SERUM FROM RABBITS AND HUMANS WITH AN INFLAMMATORY REACTION

Mihaela Levitchi, Caroline Fradette, Anne-Marie Bleau, Dorothée Michaud, Oksana Kourylko, Mathieu Arcand and Patrick du Souich*

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal,
Québec, Canada

Article publié dans *Biochemical Pharmacology*, 68(3):573-582, 2004.

2.1 Abstract

Incubation of serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction and from humans with an upper respiratory viral infection with hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction for 4 h reduces total cytochrome P450 content and activity of cytochrome P450 isoforms CYP1A1/1A2 and 3A6 without affecting the expression of these proteins. To document the signal transduction pathways implicated in the decrease in CYP1A1/1A2 and 3A6 activity, hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction were incubated with serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction, serum from individuals with a viral infection and interleukin-6 for 4 h in presence of inhibitors of protein kinases. The sera-induced decrease in CYP1A1/1A2 and 3A6 activity was partially prevented by the inhibition of Janus-associated protein tyrosine kinase, double-stranded RNA-dependent protein kinase, protein kinase C, and p42/44 mitogen-activated protein kinase. The serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction increased the phosphorylation of Erk1/2, effect prevented by PD98059 but not by bisindolylmaleimide, a specific inhibitor of protein kinase C. The results demonstrated that the decrease in total cytochrome P450 content and in CYP1A1/1A2 and CYP3A6 activity by sera and interleukin-6 involves the activation of protein tyrosine kinases, p42/44 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. Indirect evidence supported that nitric oxide is implicated in the decrease in activity of these enzymes.

ABBREVIATIONS: CYP, apoprotein of the cytochrome P450; DFB, 3,4-difluorobenzyloxy-5,5 dimethyl-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one; DFH, 3-hydroxy-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one; 1,3DMU, 1,3-dimethyluric acid; Erk1/2, extracellular signal-related kinase 1/2; H_{CONT}, hepatocytes from a control rabbit; H_{TIIR}, hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction; HS_{CONT}, serum from healthy volunteers; HS_{URVI}, serum from individuals with an upper respiratory tract viral infection; IFN- γ , interferon- γ ; IL-, interleukin; JAK, Janus-associated protein tyrosine kinase; L-NAME, N^o-nitro-L-arginine methyl ester; p42/44 MAPK, p42/44 mitogen-activated protein kinases; MDA malondialdehyde; 1MU, 1-methyluric acid; 3MX, 3-methylxanthine; NO^{*}, nitric oxide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NOS, nitric oxide synthase; PKA, cAMP-dependent protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKR, double-stranded RNA-dependent protein kinase; PTK, protein tyrosine kinase; RS_{CONT}, serum from control rabbits; RS_{TIIR}, serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

Key words: cytochrome P450, activity, signal transduction pathways, inflammation, turpentine, viral.

2.2 Introduction

Infections and inflammatory reactions trigger an acute phase response that reduces the activity and total cytochrome P450 content [1]. In humans, bacterial pneumonia [2], influenza vaccines [3], and acute influenza infections [4] reduce monooxygenases activity. In animals, the injection of bacteria, viruses, parasites or inflammatory agents, such as turpentine or carrageenan, diminish the amount and drug-metabolising activity of hepatic cytochrome 450 [5].

In vivo, the down-regulation of cytochrome P450 occasioned by turpentine is preceded by a reduction in cytochrome 450 activity [6]. *In vitro*, incubation of hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{TIR}) for 4 h with serum from individuals with an acute upper respiratory tract viral infection (HS_{URVI}) and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}) reduce the catalytic activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 without affecting their expression [7]. The serum mediators implicated in the decrease in cytochrome P450 activity by RS_{TIR} and HS_{URVI} are interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β [8]. The signal transduction pathways and mechanisms underlying the decrease in cytochrome P450 activity produced by IFN- γ , IL-6 and IL-1 β remain unknown.

Circumstantial evidence suggest that the expression of cytochrome P450 isoforms is modulated by IFN- γ , IL-6 and IL-1 β through the activation of several signal transduction pathways, such as Janus-associated protein tyrosine kinase (JAK) and the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), protein kinase C (PKC),

cAMP-dependent protein kinase A (PKA), and p42/44 mitogen-activated protein kinases (p42/44 MAPK) [9-14]. Moreover, IFN- γ activates double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) which is a major negative regulator of translation and consequently, an inhibitor of protein synthesis [15]. The aim of this study was to assess the signal transduction pathways activated by RS_{TIR}, HS_{URVI}, and IL-6 leading to the decrease in total cytochrome P450 content and CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity in hepatocytes.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Hepatocyte isolation and culture conditions

Male New Zealand rabbits (2-2.3 kg) (Ferme Cunicole, St. Valérien, QC, Canada) were housed in separate cages and fed water and chow *ad libitum* for at least 7 days before experiments started. The inflammatory reaction was provoked by local subcutaneous injections of turpentine distributed at four sites of the back of the rabbits (total volume injected 5 ml). The severity of the inflammatory reaction was assessed by taking the rectal temperature and by measuring the concentration of seromucoids [5]. All experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Forty-eight hours after the injection of turpentine, a blood sample (15 ml) was withdrawn from the rabbits in a sterile Vacutainer Brand SST (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). Thereafter, hepatocytes were isolated according to the two-step liver perfusion method [16] with minor modifications [7]. Harvested cells were centrifuged on isodensity Percoll to isolate viable liver cells (90% viability as assessed by trypan blue exclusion). Hepatocytes (3×10^6 in 3 ml of William's medium E supplemented with 10% calf serum) were plated in 12-well plastic culture plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Rutherford, NJ) coated with type I rat tail collagen. Cell culture was conducted under sterile conditions and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. The medium was changed 2 h after

plating, prior to the addition of serum or IL-6, and thereafter the hepatocytes were incubated for an additional 4 h.

2.3.2 Preparation of human serum

Human blood (20 ml) was withdrawn from volunteers, either healthy or presenting an inflammatory reaction secondary to an upper respiratory viral infection, at the apex of symptomatology, i.e. 24-48 h after the onset of clinical symptomatology (fever, rhinorrhea, sneezing, nasal congestion, sore throat, cough and systemic signs of malaise). Blood samples were allowed to clot at room temperature for 2 h, centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -80°C in 1 ml aliquots until use. Preliminary studies have shown that when samples were handled as described, serum mediators conserve their activity for up to 12 months. Human sampling protocol was approved by the Comité d'éthique de la recherche de la Faculté de médecine of the University of Montréal (CERFM 28(00) 4#78).

Aliquots of 200 µl of serum from rabbits or from human volunteers were incubated for 4 h with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and H_{TIR} , and the effect on cytochrome P450 was assessed by measuring total cytochrome P450 content and CYP1A1/1A2 and 3A6 activity. Since IL-6 is the serum mediator responsible for the decrease in cytochrome P450 activity in rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction [8], recombinant IL-6 was incubated with H_{CONT} and H_{TIR} for 4 h.

2.3.3 Signal transduction pathways modulating CYP1A1 and 1A2 activity

There is indirect evidence suggesting that nitric oxide (NO[•]) is implicated in the reduction of CYP1A1/1A2 activity produced by the administration of lipopolysaccharide and by a turpentine-induced inflammatory reaction [17-19]. Therefore, signal transduction pathways leading to the production of NO[•] were primarily investigated.

The signal transduction pathways implicated in the decrease in CYP1A1/1A2 activity induced by RS_{TIR} (n = 7) were investigated by incubating H_{TIR} with a) genistein or 4',5,7-trihydroxyisoflavone (90 μM), an unspecific inhibitor of JAK [20], b) 2-aminopurine (0.5 μM), an adenine isomer that inhibits specific kinases that phosphorylate PKR [21], c) bisindolylmaleimide (100 nM), a specific inhibitor of PKC [22], d) PD98059 (10 μM), a specific inhibitor of p42/44 MAPK [23], e) pyrrolidine dithiocarbamate (10 μM), an antioxidant that specifically inhibits the nuclear factor-κB (NF-κB) pathway by scavenging reactive oxygen intermediates (ROI) and/or by inhibiting ubiquitin ligase activity towards phosphorylated I_κB_α [24], and f) N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 1 mM), an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) and NO[•] production. Preliminary studies confirmed that genistein, 2-aminopurine, bisindolylmaleimide, PD98059, pyrrolidine dithiocarbamate and L-NAME did not affect total cytochrome P450 content and CYP1A1, 1A2 and 3A6 activities.

In these experiments, hepatocytes were plated in 12-well plastic culture plates, the medium was changed 2 h after plating, and 30 min later the inhibitors were added. Following the incubation of the inhibitors and the hepatocytes for 30 min, 200 μl of

RS_{TIR} (n = 7) were added to the H_{TIR} (n = 3) and further incubated for 4 h. Genistein, bisindolylmaleimide and PD98059 were dissolved in dimethyl sulfoxide, and 2-aminopurine, pyrrolidine dithiocarbamate and L-NAME in NaCl 0.9%, and 5 µl of the solutions were added to the hepatocytes in culture.

To confirm that incubation of serum activated p42/44 MAPK

To ensure that the present experiments are in agreement with previous studies, when possible the activity of CYP1A2 and 1A1 was assessed by measuring the rate of formation of theophylline of each individual metabolite, e.g. 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) [7,8,19,25]. Theophylline was dissolved in serum-free William's medium E, and 100 µl were added to each well containing hepatocytes to attain a final concentration of 176 µM. After 4 h incubation, the medium was collected and frozen at -20°C until analysis of theophylline, 3MX, 1MU and 1,3DMU by HPLC [25].

In presence of some inhibitors, theophylline could not be used as substrate to assess CYP1A1/1A2 activity because dimethyl sulfoxide interferes with the HPLC assay of theophylline metabolites. Therefore, CYP1A1/1A2 activity was quantified by measuring the methoxyresorufin O-demethylation (MROD) to resorufin in intact cells, as described by Van Vleet et coll. [26]. Growth media was removed and cells washed twice with 300 µl of Krebs solution. After removal of Krebs solution, 3.3 µM methoxyresorufin in 300 µl of ^{Krebs} solution was added to the wells containing the hepatocytes and incubated for 10 min at 37°C. Thereafter, 100 µl of the supernatant were added to 100 µl of a solution of perchloric acid/glycine and 5.4% K₂CO₃ (2:1, v/v). Resorufin production was

measured fluorimetrically at excitation and emission wavelengths of 530 and 584 nm, respectively, with a fluorescent plate reader (Wallac Victor2 1420 multilabel counter, Perkin Elmer).

2.3.4 Signal transduction pathways modulating CYP3A6 activity

H_{THIR} were incubated for 30 min with a) phloretin (500 μ M), a chalcone derivative intermediate precursor for all flavonoid compounds, which is a non-specific inhibitor of protein tyrosine kinase (PTK) and PKC [27,28], b) 2-aminopurine (0.5 μ M), c) bisindolylmaleimide (100 nM), and d) PD98059 (10 μ M). Phloretin, bisindolylmaleimide and PD98059 were dissolved in dimethyl sulfoxide, and 2-aminopurine in NaCl 0.9%, and 5 μ l of the solutions were added to the hepatocytes in culture. Thirty minutes later, 200 μ l of RS_{THIR} (n = 7), 200 μ l of HS_{URVI} (n = 4), and 20 ng of interleukin-6 were added to the H_{THIR} (n = 8) and further incubated for 4 h. The concentration used of IL-6 was similar to that assayed in the plasma of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction [29].

The activity of CYP3A6 was determined by measuring the ability of the hepatocytes to convert 3,4-difluorobenzyloxy-5,5 dimethyl-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFB), a CYP3A probe, to 3-hydroxy-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFH), its fluorescent metabolite [30]. Incubations were performed according to a published procedure [31]. Briefly, 60 μ M of DFB were incubated for 20 min with the hepatocytes that had been previously incubated with the inhibitors and the serum. An aliquot of the supernatant was then transferred to a microtiter plate and quenched with an equal volume of acetonitrile containing 40% TRIS buffer (0.05 M).

The fluorescence metabolite DFH was measured at excitation and emission wavelengths of 360 nm and 440 nm, respectively, using a fluorescent plate reader (Wallac Victor² 1420 multilabel counter, Perkin Elmer).

2.3.5 Effect of NO[•] on CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity

To assess the effect of NO[•] on CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity, H_{TIR} (n = 6) were incubated with 0.5 mM of sodium nitroprusside [19] in presence and in absence of the inhibitors previously mentioned. Control experiments were conducted by incubating H_{CONT} with RS_{TIR}, HS_{URVI}, IL-6, sodium nitroprusside, and the kinase inhibitors at the above-mentioned concentrations and total cytochrome P450 content was assessed 4 h later.

2.3.6 Measure of total cytochrome P450 content and NO[•]

Total cytochrome P450 content was assessed spectrophotometrically by its ability to bind carbon monoxide [32]. Protein content in hepatocytes was measured by the method of Lowry et coll. [33]. Nitric oxide was determined by measuring nitrite and nitrate in the culture media using a colorimetric method based on the Griess reaction [34]. To reduce nitrate to nitrite, samples were incubated at 37 °C in the presence of 0.1 U/ml nitrate reductase, 50 µM NADPH and 5 µM FAD. Following nitrate reduction, to avoid any interference with the determination of nitrite, NADPH was oxidized by incubating the samples with 10 U/ml lactate dehydrogenase and 10 mM sodium pyruvate for 5 min

at 37°C. All along the manuscript, it has been assumed that the concentration of nitrite reflected that of nitric oxide and the results are expressed as concentration of NO[•].

2.3.7 Measure of the expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins

The amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins in H_{TIR} incubated for 4 h with serum and interleukin-6 was assessed by Western blot analysis. Proteins were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% polyacrylamide) [35]. Proteins were electrophoretically transferred to a nitro-cellulose membrane using a semidry transfer process (Bio-Rad, Hercules, California). CYP1A1 and 1A2 proteins were detected with polyclonal anti-rabbit CYP1A1 and visualized with an alkaline phosphatase conjugated secondary goat antibody using blue tetrazolium as the substrate [36]. CYP3A6 protein was detected with a monoclonal anti-rat CYP3A1, with cross-reactivity to rabbit's CYP3A6, and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Chemiluminescence was visualized by autoradiography [37]. In each gel, 50 µg of proteins extracted from the same batch of H_{CONT}, with constant amounts of CYP1A1, 1A2 and 3A6, were used as reference proteins. The assay was linear in the range of protein amounts assessed under the present experimental conditions. The intensities of the bands were measured with the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah), and the results are presented as the ratio to the reference protein.

2.3.8 Immunoblot analysis of Erk1 and Erk2

The H_{TIR} were incubated with RS_{CONT} and RS_{TIR} in absence and in presence of various doses of PD98059 (10-100 μ M) and of bisindolylmaleimide (100-200 μ M). Protein extracts were prepared by homogenization of hepatocytes in lysis buffer. Equal amounts of protein were resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nylon membrane. The membrane was blocked in TBS, 0.1% Tween 20, 4% non-fat dried milk, and probed with antibody α 1cp44 (1:1000 dilution), which recognizes Erk1 and Erk2 isoforms [38]. To control for protein loading, the blot was stripped and reprobed with anti- β -actin (1:10,000 dilution). We also used an Erk2 N-terminal-specific polyclonal antibody (AB3055; Chemicon) to confirm the absence of expression of N-terminal fragments of Erk2. The anti-ERK1/2 phosphothreonine 183, phosphotyrosine185 (ppERK1/2) E10 monoclonal antibody was purchased from Cell Signalling Technology and was diluted 1:1000 according to manufacturer's instructions.

2.3.9 Materials

Percoll gradient, William's medium E, calf serum, type I rat tail collagen, trypsin inhibitor, NaCl, KCl, KH₂PO₄, EGTA, glucose, theophylline, 3MX, 1MU acid and 1,3DMU, genistein, 2-aminopurine, bisindolylmaleimide, pyrrolidine dithiocarbamate and L-NAME were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO, USA), insulin, nitrate reductase, lactate dehydrogenase and sodium pyruvate from Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Germany). Collagenase A was acquired from

Worthington Biochemical Corp. 6-Well plastic culture plates were obtained from Falcon, Becton Dickinson Labware, (Rutherford, NJ, USA), turpentine from Recochem (Montréal, Québec). Phloretin, PD98059 and hrIL-6 were purchased from Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, CA, USA). Polyclonal anti-rabbit CYP1A1 and monoclonal anti-rat CYP3A1 were from Oxford Biochemical Research (Oxford, MI, USA).

2.3.10 Statistical analysis

All results are reported as means \pm s.e. The comparison of the results from the various experimental groups and their corresponding controls was carried out using a one way analysis of variance (ANOVA) followed by pairwise multiple comparison procedures Tuckey test. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

2.4 Results

2.4.1 Effect of RS_{THIR}, HS_{URVI} and IL-6 on total cytochrome P450 content and activity

In control rabbits ($n = 11$), mean rectal temperature was $38.7 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, and average seromucoids concentration was 21.4 ± 2.8 mg/dl. Whereas in rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction ($n = 11$), rectal temperature was $41.1 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ ($P < 0.05$) and average seromucoids concentration was 69.8 ± 2.3 mg/dl ($P < 0.05$).

Compared with H_{CONT}, in H_{THIR} total cytochrome P450 content was diminished ($P < 0.05$) (Table I), the activity of CYP1A1 and 1A2 was decreased by 30 to 70% depending upon

the metabolite of theophylline considered ($P<0.05$), and the activity of CYP3A6 was diminished by 41% ($P<0.05$). Moreover, compared with H_{CONT} , in H_{TIR} , the amount from CYP1A1 and 1A2 isoforms was reduced by 24% and 35% ($P<0.05$) and that of CYP3A6 by around 85% (Fig. 1).

In H_{CONT} , total cytochrome P450 content and activity of CYP1A1/1A2 and 3A6 were not affected by 4 h incubation with serum from control rabbits (RS_{CONT}), RS_{TIR} , serum from healthy volunteers (HS_{CONT}), and HS_{URVI} (data not shown). In H_{TIR} , these parameters were not affected by RS_{CONT} and HS_{CONT} (data not shown). However, compared with the RS_{CONT} , incubation of H_{TIR} with RS_{TIR} for 4 h further decreased total cytochrome P450 content ($P<0.05$), and the activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 ($P<0.05$) (Table I). Similarly, compared with HS_{CONT} , incubation of HS_{URVI} with H_{TIR} for 4 h, reduced total cytochrome P450 content, as well as the activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 ($P<0.05$), as reflected by the production of theophylline metabolites and of DFH (Table I). However, incubation of RS_{TIR} and HS_{URVI} with H_{TIR} for 4 h did not affect the expression of CYP1A1, 1A2, and 3A6 apoproteins (Fig. 1).

Compared with H_{TIR} alone, incubation of IL-6 with H_{TIR} for 4 h reduced total cytochrome P450 content ($P<0.05$), and the activity of CYP1A1, 1A2, and 3A6 ($P<0.05$) as reflected by the production of theophylline metabolites and of DFH (Table I), although it did not affect the expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 (Fig. 1).

Table 1. Effect of a turpentine-induced inflammatory reaction (TIIR), serum from rabbits with a TIIR (RS_{TIIR}) and from individuals with an upper respiratory viral infection (HS_{URVI}), interleukin-6 (IL-6) and sodium nitroprussiate (SNP) on total cytochrome P450 content and activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 in hepatocytes from control (H_{CONT}) and rabbits with a TIIR (H_{TIIR}).

units)	Cytochrome P450 (nmol/mg protein)	CYP1A1/1A2 ACTIVITY ^a			CYP3A6 ACTIVITY ^a	
		3MX	1MU (ng/ml/min)	1,3DMU	DFH (arbitrary)	
H _{CONT}	0.24 ± 0.06	0.108 ± 0.013	0.275 ± 0.054	6.13 ± 0.85	5160 ± 90	
H _{TIIR}	0.14 ± 0.05 ^b	0.075 ± 0.038 ^b	0.138 ± 0.038 ^b	1.86 ± 0.15 ^b	3246 ± 141 ^b	
H _{TIIR} + RS _{CONT}	0.15 ± 0.02	0.092 ± 0.013	0.146 ± 0.050	1.61 ± 0.12	3682 ± 163	
H _{TIIR} + RS _{TIIR}	0.10 ± 0.04 ^c	0.063 ± 0.010	0.058 ± 0.025 ^c	1.18 ± 0.05 ^c	2990 ± 72 ^c	
H _{TIIR} + HS _{CONT}	0.13 ± 0.03	0.096 ± 0.025	0.150 ± 0.033	1.58 ± 0.21	3214 ± 118	
H _{TIIR} + HS _{URVI}	0.08 ± 0.03 ^c	0.075 ± 0.025	0.083 ± 0.038 ^c	1.13 ± 0.31 ^c	2720 ± 68 ^c	
H _{TIIR} + IL-6	0.10 ± 0.03 ^d	0.088 ± 0.017	0.067 ± 0.010 ^d	1.17 ± 0.34 ^d	2600 ± 112 ^c	
H _{TIIR} + SNP	0.08 ± 0.04 ^d	0.043 ± 0.022 ^d	0.080 ± 0.022 ^d	1.02 ± 0.08 ^d	1164 ± 59 ^d	

Values are mean ± sem. RS_{CONT} and HS_{CONT} are serum from control rabbits and healthy volunteers, respectively.

^a the activity of CYP1A1/1A2 is determined by the rate of production of each individual metabolite of theophylline, e.g. 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU). The activity of CYP3A6 was determined by the production of 3-hydroxy-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFH) a fluorescent metabolite.

^b $p < 0.05$ compared with H_{CONT}

^c $p < 0.05$ compared with H_{TIIR} + RS_{CONT} or H_{TIIR} + HS_{CONT}

^d $p < 0.05$ compared with H_{TIIR}

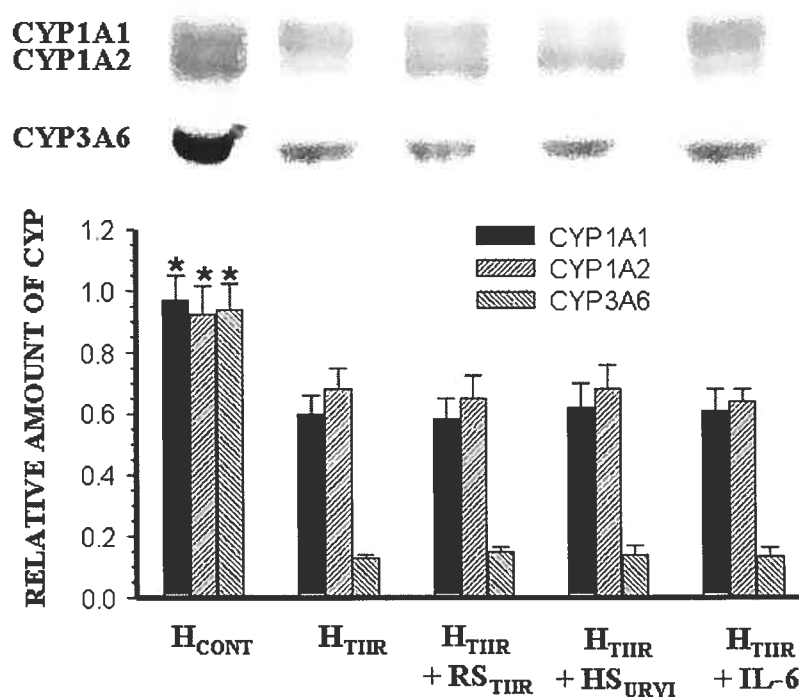


Figure 1

Amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{TIIR}), following 4 h of incubation with NaCl 0.9%, serum of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIIR}), serum from individuals with an upper respiratory viral infection (HS_{URVI}), and interleukin-6 (IL-6).

2.4.2 Signal transduction pathways regulating total cytochrome P450 content, and CYP1A1/1A2 and 3A6 activity

Incubation of phloretin, 2-aminopurine, bisindolylmaleimide, and PD98059 with H_{TIR} prevented the decrease in total cytochrome P450 content produced by RS_{TIR} , HS_{URVI} and IL-6 (Fig. 2). Compared with H_{TIR} incubated with RS_{CONT} , incubation with RS_{TIR} reduced the activity of CYP1A1/1A2 by 14% ($P < 0.05$) as measured by the demethylation of MROD (Fig. 3). The inhibitors of PTK, PKR, PKC, and p22/44 MAPK, as well as the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate and L-NAME partially prevented the reduction in CYP1A1/1A2 activity produced by RS_{TIR} . Pre-incubation of H_{TIR} with phloretin, 2-aminopurine, bisindolylmaleimide, and PD98059 did not totally prevent the decrease in CYP3A6 activity produced by RS_{TIR} , and HS_{URVI} (Fig. 4). In H_{TIR} , phosphorylated Erk1/2 (ppErk1/2) were barely detectable (Fig. 5), and as expected, the addition of RS_{CONT} increased the amount of ppErk1/2, although the increase in ppErk1/2 was much more pronounced when H_{TIR} was incubated with RS_{TIR} (Fig. 5). PD98059 inhibited dose-dependently the phosphorylation of Erk1/2 induced by RS_{TIR} , although bisindolylmaleimide did not impede the phosphorylation of Erk1/2 indicating that the activation of Erk1/2 is independent of PKC (data not shown).

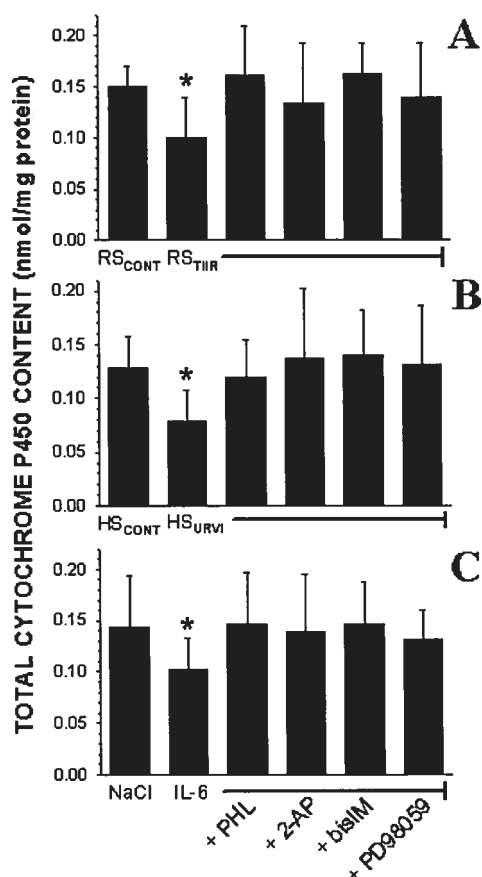


Figure 2

Total cytochrome P450 content of hepatocytes harvested from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{TIR}) following 4 h of incubation with serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}) (panel A), serum from individuals with an upper viral respiratory infection (HS_{URVI}) (panel B), and interleukin-6 (IL-6) (panel C) in absence or in presence of phloretin (PHL), 2-aminopuine (2-AP), bisindolylmaleimide (bisIM), and PD98059. RS_{CONT} is serum from control rabbits. * $p < 0.05$ compared with RS_{CONT} or NaCl. Vertical bars are s.e.m.

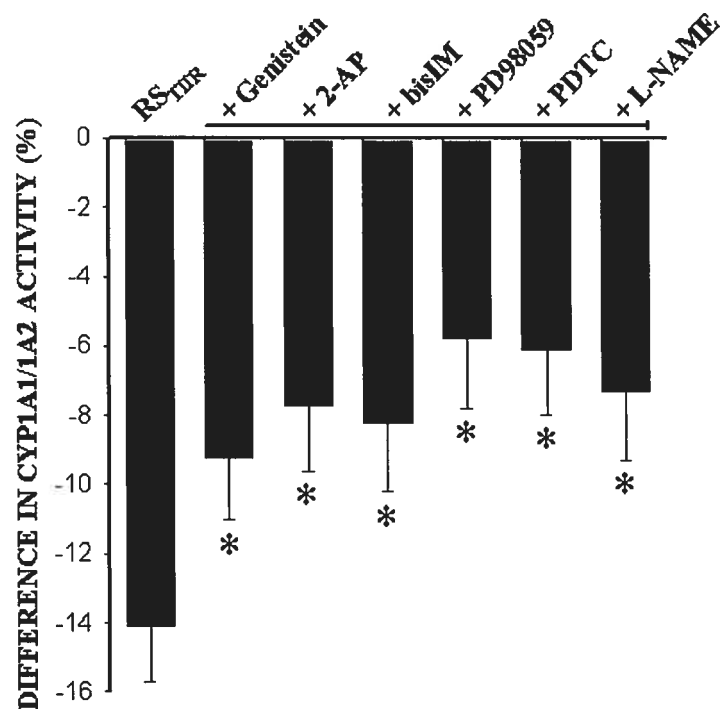


Figure 3

Decrease in CYP1A1/1A2 activity in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction following 4 h incubation with serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}), in absence and presence of genistein, 2-aminopurine (2-AP), bisindolylmaleimide (bisIM), PD98059, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). CYP1A1/1A2 activity was assessed by means of the O-demethylation of methoxyresorufin. Values are presented as percentage difference with baseline CYP1A1/1A2 activity in hepatocytes of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction. * p<0.05 compared with RS_{TIR}. Vertical bars are s.e.m.

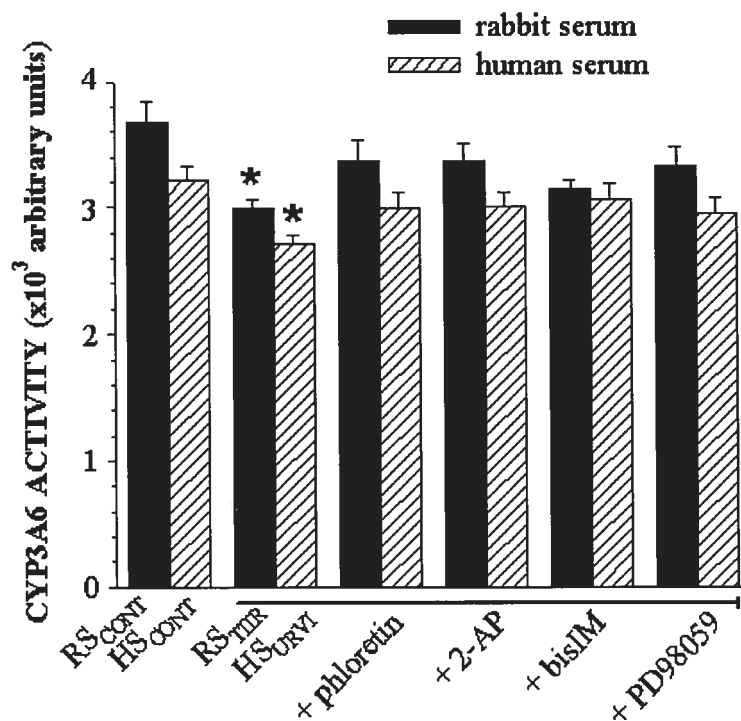


Figure 4

Activity of CYP3A6 in hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction incubated for 4 h with serum of rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RSTIR) and with serum from individuals with an upper viral respiratory infection (HSTIRVI) in absence and presence of phloretin, 2-aminopurine (2-AP), bisindolylmaleimide (bisIM), and PD98059. * $p < 0.05$ compared with serum from control rabbits (RSCONT) and humans (HSCONT). Vertical bars are s.e.m. of arbitrary units.

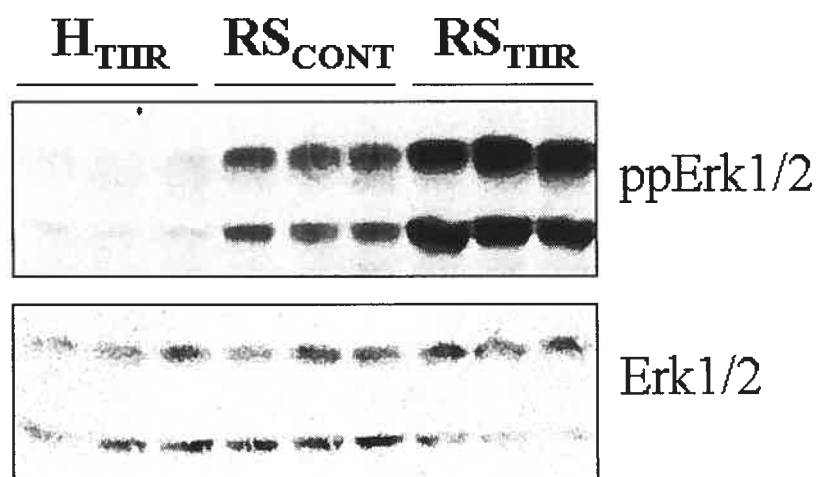


Figure 5

Effect of serum from control rabbits (RS_{CONT}) and from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIIR}) on total extracellular signal-related kinase 1/2 (Erk1/2) and on phosphorylated Erk1/2 (ppErk1/2) in hepatocytes harvested from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (H_{TIIR}).

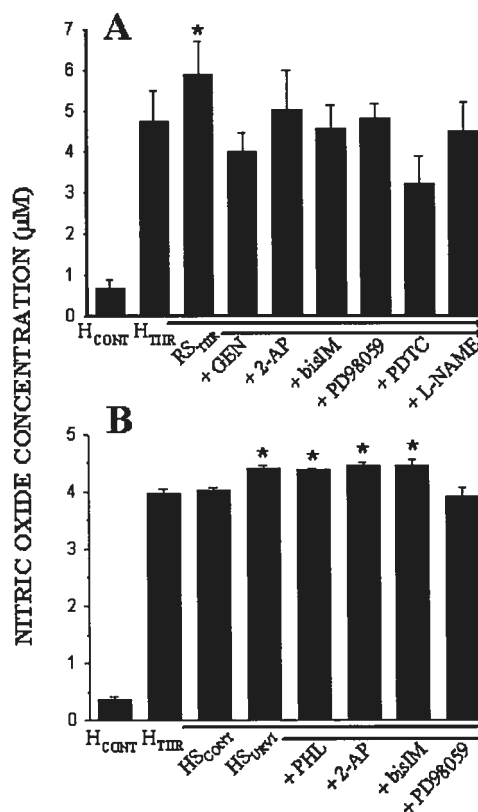


Figure 6

Nitric oxide concentration in the supernatant of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) and in hepatocytes from rabbits with a turpentine-inflammatory reaction (H_{TIR}) incubated for 4 h with serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction (RS_{TIR}) (panel A) and with serum from individuals with an upper tract viral respiratory infection (HS_{URVI}) (panel B), in absence or in presence of genistein (GEN), 2-aminopurine (2-AP), bisindolylmaleimide (bisIM), PD98059, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), and phloretin (PHL). Total nitrate was estimated by the Griess reaction and assumed to reflect nitric oxide. * p<0.05 compared with H_{TIR}. Vertical bars are s.e.m.

2.4.3 Effect of protein-kinases inhibitors on NO[•] concentrations in H_{TIR} and on sodium nitroprusside-induced decrease in cytochrome P450 content

By comparison with H_{CONT}, average concentration of NO[•] was approximately ten fold greater in the supernatant of H_{TIR} (Fig. 6). Incubation of RS_{TIR} and HS_{URVI} with H_{TIR} for 4 h raised the concentration of NO[•] ($P < 0.05$). The increase in NO[•] induced by RS_{TIR} was prevented by pre-incubating the hepatocytes with the inhibitors of PTK, PKR, PKC, and p22/44 MAPK, as well as with pyrrolidine dithiocarbamate and L-NAME. On the other hand, the increase in NO[•] induced by HS_{URVI} was prevented only by the inhibition of p42/44 MAPK (Fig. 6).

Exposure of H_{TIR} to sodium nitroprusside decreased total cytochrome P450 content by 43% ($n = 6$) ($P < 0.05$) (Table I). In addition, sodium nitroprussiate reduced the activity of CYP1A1/1A2 by around 45% and that of CYP3A6 by 64% ($P < 0.05$) as reflected by the production of theophylline metabolites and of DFH. Sodium nitroprusside reduced total cytochrome P450 content in H_{TIR} from 0.128 ± 0.036 to 0.073 ± 0.038 nmol/mg of protein ($P < 0.05$) and pre-incubation with phloretin, 2-aminopurine, bisindolylmaleimide and PD98059 did not prevent this decrease, e.g. cytochrome P450 content was 0.095 ± 0.039 , 0.081 ± 0.042 , 0.084 ± 0.041 and 0.087 ± 0.025 nmol/mg of protein ($P > 0.05$), respectively.

2.5 Discussion

The above experiments provide evidence that incubation of RS_{TIR}, HS_{URVI} and IL-6 with hepatocytes from rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction for 4 h reduce total cytochrome P450 content and CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity, without changes in the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 isoforms. Non-specific inhibition of PTK and PKC by phloretin, inhibition of PKR by 2-aminopurine, and specific inhibition of PKC and p42/44 MAPK in H_{TIR} prevent the decrease in total cytochrome P450 content produced by the sera from rabbits and humans, and IL-6. The fact that each inhibitor prevents the decrease in total cytochrome P450 content suggest that the kinases inhibited are part of a cascade of dependent phenomena, rather than parallel redundant pathways. On the other hand, these inhibitors did not prevent completely the reduction in CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity produced by the sera and IL-6. These results suggest that the mechanisms underlying the decrease in total cytochrome P450 content and the activity of cytochrome P450 isoforms may differ. Based on these results, we may propose that the effect of rabbit and human sera and IL-6 involves the parallel activation of p42/44 MAPK and PKC [39-42]. This postulate is consistent with the signal transduction pathways activated by the serum mediators responsible for the decrease in cytochrome P450 activity, e.g. IL-6 in RS_{TIR}, and IFN- γ , IL-1 β and IL-6 in HS_{URVI} [8].

Total cytochrome P450 content decreased without the reduction in the expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 isoforms. This apparent contradiction may be explained by the fact that the spectrophotometric assay of total cytochrome P450 content is based on the

binding of carbon monoxide to reduced iron (Fe^{2+}) of the heme moiety at the binding site of O_2 . The spectrophotometric measure of total cytochrome P450 content will decrease whenever Fe^{2+} binding site is not available. Immunoquantitation of an isoform by using an antibody to a specific epitope is independent of the availability of the binding site on Fe^{2+} . Therefore, we may speculate that the decrease in total cytochrome P450 content is associated with the reduction in Fe^{2+} binding sites. The decrease in cytochrome P450 content because of the down-regulation of isoforms other than CYP1A1, 1A2 and 3A6, following the incubation of hepatocytes with sera and IL-6 for 4 h is difficult to reconcile with the long half-life of cytochrome P450 isoforms [43], and the fact that CYP3A6 constitutes almost 50% of total cytochrome P450 content.

The catalytic activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 was decreased by RS_{TIR} , HS_{URVI} and IL-6. This decrease in CYP1A1, 1A2 3A6 activity by RS_{TIR} is partially prevented by the inhibition of PTK, PKR, PKC, and p22/44 MAPK. Direct phosphorylation of the apoprotein will denature it with loss of catalytic activity [44]. *In vitro*, CYP2B1/2 [45], CYP2B4 [46], CYP2C [47], CYP2E1 [48], and CYP3A1 [49] can be phosphorylated on serine residues by PKC [12]. Not all cytochrome P450 isoforms are equally sensitive to phosphorylation, CYP1A1 and 1A2 are less prone to be phosphorylated by PKC [50,51]. Another mechanism that may explain the decrease in CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity could involve NO^{\bullet} [17,52]. NO^{\bullet} can reduce the activity of cytochrome P450 isoforms by two mechanisms. In first place, NO^{\bullet} interacts with the Fe^{2+} - and Fe^{3+} -heme at the active centre of cytochrome P450 isoforms, resulting in a reversible inactivation of the enzyme [53]. Secondly, NO^{\bullet} can nitrate tyrosine residues in the proximity of the active site

culminating in the irreversible inactivation of the isoforms [54]. Probably the two mechanisms of inactivation are sequential, with an early binding to $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ and a later nitration of tyrosine residues [55].

There are several pieces of evidence indirectly supporting that NO^{\bullet} contributes to the reduction of the activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 produced by sera and IL-6. The catalytic activity of cytochrome P450 isoforms depends upon binding of O_2 to Fe^{2+} to form the cytochrome P450-dioxygen complex required to transfer an oxygen atom to the substrate. Therefore, the decrease in cytochrome P450 content without changes in expression is compatible with the hypothesis that NO^{\bullet} binds to Fe^{2+} and reduces its catalytic activity, as well as carbon monoxide binding for its spectrophotometric measure. Moreover, the present study provides evidence that an excess of NO^{\bullet} generated by sodium nitroprussiate reduces the activity of CYP 1A1, 1A2, and 3A6. Finally, RS_{TIR} increased NO^{\bullet} production, and L-NAME prevented the increase in NO^{\bullet} and partially the reduction in CYP1A1/1A2 activity. These last results are in agreement with reports showing that *in vivo* L-NAME partially prevents the reduction in CYP1A1/1A2 activity produced by a turpentine-induced inflammatory reaction [6]. Moreover, *in vitro*, L-NAME dose-dependently hinders the decrease in CYP1A1 and 1A2 activity and in total cytochrome P450 content triggered by RS_{TIR} and HS_{URVI} [19].

Circumstantial evidence further supports the hypothesis that NO^{\bullet} and ROI are implicated in the modulation of CYP1A1/1A2 activity. Inhibition of NF- κ B by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate elicits almost the same effect as PD98059 and L-NAME. This is because p42/44 MAPK and ROI activate the nuclear translocation of NF- κ B and

binding to NOS promoter, resulting in a rapid (less than 4 h) increase in NOS expression, and NO^\bullet production [56-58]. Moreover, it has been reported that ROI can increase the formation of NO^\bullet in the matter of minutes due to an enhanced transport of L-arginine into the cell, which depends upon p42/44 MAPK [59-62]. The decrease in CYP1A1 and 1A2 activity in H_{TIR} by sera is closely associated to the presence of ROI because on the one hand, the antioxidants N-acetylcysteine and dimethylthiourea prevent dose-dependently the effect of RS_{TIR} and HS_{URVI} on cytochrome P450 activity; on the other hand, the addition of diethyldithiocarbamate, an inhibitor of superoxide dismutase, of DL-buthionine-(R,S)-sulfoximine, an inhibitor of glutathione peroxidase, and of 3-amino-1,2,4-triazole, and inhibitor of catalase, potentiate the effect of sera on CYP1A1, 1A2 and 3A6 activity and total cytochrome P450 content [19].

In conclusion, the present study demonstrates that the process leading to the decrease in CYP1A1 1A2, and 3A6 activity triggered by RS_{TIR} , HS_{URVI} and IL-6 involves the activation of PTK, p42/44 MAPK and PKC. Indirect evidence supports that NO^\bullet is implicated in the decrease in activity of these enzymes, although in the case of CYP1A1/1A2 several mechanisms may contribute to regulate its activity.

2.6 Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research, grant #MOP-43925. We thank Lucie Héroux for her excellent technical assistance. We are grateful to Dr N. Chauret from Merck Frosst Canada for providing 3,4-difluorobenzyloxy-5,5-dimethyl-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFB).

2.7 References

- [1] Mannering GJ, Deloria LB, The pharmacology and toxicology of interferons: An overview. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986;26: 455-515.
- [2] Vozeh S, Powell JR, Riegelman S, Costello JF, Scheiner LB, Hopewell P, Changes in theophylline clearance during acute illness. *J Am Med Ass* 1978;240: 1882-84.
- [3] Renton KW, Gray JD, Hall RI, Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination. *Can Med Assoc J* 1981;123: 288-90.
- [4] Brockmeyer NH, Barthel B, Mertins L, Goos M, Changes in antipyrine pharmacokinetics during influenza and after administration of interferon- α and - β . *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36: 309-11.
- [5] Parent C, Bélanger PM, Jutras L, du Souich P, Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P450 isoenzymes. Alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261: 780-7.
- [6] Barakat MM, El-Kadi AOS, du Souich P, L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction. *Life Sci* 2001;69: 1559-71.
- [7] El-Kadi AOS, Maurice H, Ong H, du Souich P, Down regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of human and animal serum, and intrahepatic mediators. *Br J Pharmacol* 1997;121 : 1164-70.

- [8] Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H, du Souich P, Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br J Pharmacol* 2000;130: 1777-84.
- [9] Joannard F, Galisteo M, Corcos L, Guillouzo A, Lagadic-Gossmann D, Regulation of phenobarbital-induction of CYP2B and CYP3A genes in rat cultured hepatocytes: involvement of several serine/threonine protein kinases and phosphatases. *Cell Biol Toxicol* 2000;16: 325-37.
- [10] Guo M, Joiakim A, Dudley DT, Reiners JJ, Suppression of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated CYP1A1 and CYP1B1 induction by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: role of transforming growth factor beta and mitogen-activated protein kinases. *Biochem Pharmacol* 2001;62: 1449-57.
- [11] Ikegwuonu FI, Christou M., Jefcoate CR, Regulation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in mouse embryo fibroblast (C3H10T1/2) cells by protein kinase C (PKC). *Biochem. Pharmacol* 1999;57: 619-30.
- [12] Moritz KU, Walter R, Leopold K, Hadasova E, Engel G, Siegmund W, Interferon- and streptolysin O-induced activation of protein kinases and inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases in rats. *Pharmazie* 1998;53: 268-71.
- [13] Marc N, Galisteo M, Lagadic-Gossmann D, Fautrel A, Joannard F, Guillouzo A, Corcos L, Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium- and cAMP-dependent pathways. *Eur J Biochem* 2000;267: 963-70.

- [14] Halder SK, Fink M, Waterman MR, Rozman DA, cAMP-responsive element binding site is essential for sterol regulation of the human lanosterol 14 α -demethylase gene (CYP51). *Mol Endocrinol* 2002;16: 1853-63.
- [15] Thomis DC, Samuel CE, Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* 1993;67: 7695-700.
- [16] Seglen PO, Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
- [17] Sewer MB, Barclay TB, Morgan ET, Down-regulation of cytochrome P450 mRNAs and proteins in mice lacking a functional NOS2 gene. *Mol Pharmacol* 1998;54: 273-9.
- [18] Takemura S, Minamiyama Y, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Inoue M, Kinoshita H, Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol* 1999;30: 1035-44.
- [19] El-Kadi AOS, Bleau AM., Dumont I, Maurice H, du Souich P, Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos* 2000;28: 1112-20.
- [20] Frey RS, Singletary KW, Genistein activates p38 mitogen-activated protein kinase, inactivates ERK1/ERK2 and decreases Cdc25C expression in immortalized human mammary epithelial cells. *J Nutr* 2003;133: 226-31.

- [21] Hu Y, Conway TW, 2-Aminopurine inhibits the double-stranded RNA-dependent protein kinase both in vitro and in vivo. *J Interferon Res* 1993;13: 323-8.
- [22] Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Lariolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J, The bisindolylmaleimide GF 109203X a potent and selective inhibitor of Protein kinase C. *J Biol Chem* 1990;266: 15771-81.
- [23] Schlüter KD, Simm A, Scäfe, M, Taimor G, Piper HM, Early response kinase and PI-3 kinase activation in adult cardiomyocytes and their role in hypertrophy. *Am J Physiol* 1999;276: 1655-63.
- [24] Hayakawa M, Miyashita H, Sakamoto I, Kitagawa M, Tanaka H, Yasuda H, Karin M, Kikugawa K, Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* 2003;22: 3356-66.
- [25] Kurdi J, Maurice H, El-Kadi AOS, Ong H, Dalkara S, Belanger PM, du Souich P, Effect of hypoxia alone or combined to inflammation and 3-methylcholanthrene on the cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br J Pharmacol* 1999;128 : 365-73.
- [26] Van Vleet TR, Mace K, Coulombe RA Jr, Comparative aflatoxin B(1) activation and cytotoxicity in human bronchial cells expressing cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Cancer Res* 2002;62: 105-12.
- [27] Li Q, Milo R, Panitch H, Bever CT Jr, Effect of propranolol and IFN-beta on the induction of MHC class II expression and cytokine production by IFN-gamma IN THP-1 human monocytic cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1998;20: 39-61.

- [28] Yang EB, Guo YJ, Zhang K, Chen YZ, Mack P, Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2001;1550: 144-52.
- [29] Turnbull A, Smith G, Lee S, Vale W, Lee K-F, Rivier C, CRF type I receptor-deficient mice exhibit a pronounced pituitary-adrenal response to local inflammation. *Endocrinology* 1999;140: 1013-17.
- [30] Chauret N, Tremblay N, Lackman RL, Gauthier JY, Silva JS, Marois J, Yergey JA, Nicoll-Griffith DA, Description of a 96-well plate assay to measure P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem* 1999;276: 215-25.
- [31] Fradette C, Bleau AM, Pichette V, Chauret N and du Souich P Hypoxia changes the expression of CYP1A1/1A2 and 3A6 by a mechanism involving the release of serum mediators. *Br J Pharmacol* 2002;137: 881-91.
- [32] Omura T, Sato R, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1965;239: 2370-8.
- [33] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-75.
- [34] Nims RW, Cook JC, Krishna MC, Christodoulou D, Poore CM, Miles AM, Grisham MB, Wink DA, Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods Enzymol* 1996;268: 93-105.

- [35] Smith BJ, SDS polyacrylamide gel electrophoresis of protein. *Methods Mol Biol* 1994;32: 23-34.
- [36] Kruger NJ, Detection of polypeptides on immunoblots using secondary antibodies or protein A. *Methods Mol Biol* 1994;32: 215-26.
- [37] Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP, Phenols as enhancers of the chemiluminescent horse-radish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitoring enzyme immunoassays. *Clin Chem* 1985;31: 1335-41.
- [38] Meloche S, Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J Cell Physiol* 1995;163: 577–588.
- [39] Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S, Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1999;84: 1127-36.
- [40] Nguyen VA, Chen J, Hong F, Ishac EJ, Gao B, Interferons activate the p42/44 mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator transcription factor) signalling pathways in hepatocytes: differential regulation by acute ethanol via a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem J* 2000; 349: 427-34.
- [41] Ishihara K, Hirano T, Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592: 281-96.

- [42] Ivaska J, Bosca L, Parker PJ, PKC epsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol* 2003;5: 363-9.
- [43] Shiraki H, Guengerich FP, Turnover of membrane proteins: kinetics of induction and degradation of seven forms of rat liver microsomal cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys* 1984;235: 86-96.
- [44] Jansson I, Curti M, Epstein PM, Peterson JA, Schenkman JB, Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction. *Arch Biochem Biophys* 1990;283: 285-92.
- [45] Bartlomowicz B, Waxman DJ, Utesch D, Oesch F, Friedberg T, Phosphorylation of carcinogen metabolizing enzymes: regulation of the phosphorylation status of the major phenobarbital inducible cytochromes P-450 in hepatocytes. *Carcinogenesis* 1989;10: 225-8.
- [46] Epstein PM, Curti M, Jansson I, Huang CK, Schenkman JB, Phosphorylation of cytochrome P450: regulation by cytochrome b5. *Arch Biochem Biophys* 1989;271: 424-32.
- [47] Pyerin W, Taniguchi H, Stier A, Oesch F, Wolf CR, Phosphorylation of rabbit liver cytochrome P-450 LM2 and its effect on monooxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122: 620-6.

- [48] Menez JF, Machu TK, Song BJ, Browning MD, Deitrich RA, Phosphorylation of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) by calmodulin dependent protein kinase, protein kinase C and cAMP dependent protein kinase. *Alcohol* 1993;28: 445-51.
- [49] Eliasson E, Mkrtchian S, Halpert JR, Ingelman-Sundberg M, Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1. *J Biol Chem* 1994;269: 18378-83.
- [50] Pyerin W, Taniguchi H, Horn F, Oesch F, Amelizard Z, Friedberg T, Wolf CR, Isoenzyme-specific phosphorylation of cytochromes P-450 and other drug metabolizing enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142: 885-92.
- [51] Oesch-Bartlomowicz B, Arens HJ, Richter B, Hengstler JG, Oesch F, Control of the mutagenicity of aromatic amines by protein kinases and phosphatases. I. The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and ortho-vanadate drastically reduce the mutagenicity of aromatic amines. *Arch Toxicol* 1997;71: 601-11.
- [52] Morgan ET, Ullrich V, Daiber A, Schmidt P, Takaya N, Shoun H, McGiff JC, Oyekan A, Hanke CJ, Campbell WB, Park CS, Kang JS, Yi HG, Cha YN, Mansuy D, Boucher JL, Cytochromes P450 and flavin monooxygenases--targets and sources of nitric oxide. *Drug Metab Dispos* 2001;29: 1366-76.
- [53] Khatsenko O, Gross S, Rifkind A, Vane J, Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450 dependent metabolism caused by immunotimulants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 11147-51.

- [54] Janig GR, Kraft R, Rabe H, Makower A, Ruckpaul K, Comparative studies on the accessibility and functional importance of tyrosine residues in cytochrome P-450 isozymes. *Biomed Biochim Acta*. 1988;47: 565-79.
- [55] Quaroni L, Reglinski J, Wolf R, Smith WE, Interaction of nitrogen monoxide with cytochrome P-450 monitored by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Biochim Biophys Acta* 1996;1296: 5-8.
- [56] Gomez-Guerrero C, Lopez-Franco O, Suzuki Y, Sanjuan G, Hernandez-Vargas P, Blanco J, Egido J, Nitric oxide production in renal cells by immune complexes: Role of kinases and nuclear factor-kappaB. *Kidney Int* 2002;62: 2022-34.
- [56] Blanchette J, Jaramillo M, Olivier M, Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology* 2003;108: 513-22.
- [58] Lee JK, Choi SS, Won JS, Suh HW, The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in C6 cells: involvement of AP-1 and NF-kappaB. *Life Sci* 2003;73: 595-609.
- [59] Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC Jr, Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2003;63: 325-31.

- [60] Flores C, Rojas S, Aguayo C, Parodi J, Mann G, Pearson JD, Casanello P, Sobrevia L, Rapid stimulation of L-arginine transport by D-glucose involves p42/44(MAPK) and nitric oxide in human umbilical vein endothelium. *Circ Res* 2003;92: 64-72.
- [61] Wyatt AW, Steinert JR, Wheeler-Jones CP, Morgan AJ, Sugden D, Pearson JD, Sobrevia L, Mann GE, Early activation of the p42/p44MAPK pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism. *FASEB J* 2002;16: 1584-94.
- [62] Pan M, Meng QH, Wolfgang CL, Lin CM, Karinch AM, Vary TC, Souba WW, Activation of intestinal arginine transport by protein kinase C is mediated by mitogen-activated protein kinases. *J Gastrointest Surg* 2002;6: 876-82.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 Discussion

Chez les humains et chez les animaux, l'infection et les stimuli inflammatoires produisent des changements de l'activité et de l'expression de différentes isoformes du cytochrome P450 dans le foie et dans des tissus extrahépatiques comme le rein et le cerveau (Iber, 1999).

Une réduction de l'activité catalytique du cytochrome P450 hépatique peut conduire soit à une augmentation de l'incidence des effets toxiques des médicaments ayant un faible index thérapeutique, ou à une diminution de l'effet thérapeutique de pro-médicaments nécessitant une activation par ces enzymes du cytochrome P450. L'intérêt clinique de ces observations est élargi par l'utilisation de plus en plus courante des interférons dans le traitement des tumeurs solides, des hémopathies malignes et des hépatites virales et par le potentiel thérapeutique des autres cytokines, le $\text{TNF}\alpha$ étant utilisé avec succès dans le traitement des mélanomes récurrents et de l'arthrite rhumatoïde.

Les résultats de mon projet de recherche confirment que l'incubation pendant quatre heures de RS_{TIR} , du HS_{URVI} et de l'IL-6 avec des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire secondaire à l'injection sous-cutanée de térébenthine, produit une diminution du cytochrome P450 total et de l'activité des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6, sans affecter la quantité de protéines de ces isoformes.

La réponse inflammatoire est déclenchée au site d'injection de la térébenthine par la libération de l'IL-1 β par les macrophages et les mastocytes. L'IL-1 β stimule la libération de l'IL-6 et ensembles, elles sont responsables de l'induction de l'expression des protéines de phase aiguë et de la régulation négative des autres protéines (ex. l'albumine) au niveau du foie (Fattori et coll., 1994; Gabay et Kushner, 1999). Fattori et ses collaborateurs (1994) ont observé que la souris déficiente en IL-6, qui reçoit une injection locale de térébenthine ne développe pas une réaction inflammatoire normale, ce qui démontre le rôle essentiel joué par l'IL-6 dans ce modèle d'inflammation. En utilisant le même modèle que celui de Fattori et coll., Siewert et ses collaborateurs, (2000), ont montré que parmi plusieurs cytokines, l'IL-6 joue le rôle le plus important dans la régulation négative du cytochrome P450 pendant une réaction inflammatoire aseptique locale. L'injection de la térébenthine produit une régulation négative des ARNm codant pour les CYP1A2, CYP2A5 et CYP3A11 chez la souris de type sauvage. Cet effet est absent chez la souris déficiente en IL-6. Parallèlement, l'étude de Bleau et coll., (2000), confirme que l'IL-6 est le médiateur sérique responsable de l'inactivation des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 par le RS_{THIR} dans des hépatocytes de lapins ayant une réaction inflammatoire.

Le sérum provenant d'humains avec une infection virale des voies respiratoires supérieures contient plusieurs médiateurs : l'INF γ , le TNF α et l'IL-6. Cette variété en médiateurs appuie l'hypothèse que chaque type d'inflammation déclenche des nombreux

mécanismes avec des caractéristiques spécifiques qui mènent à la sécrétion d'une variété de cytokines bien précise (Morgan, 1999, Bleau et coll., 2000).

L'inhibition non-spécifique des protéines tyrosine kinases (PTK) et de la PKC par le phloretin, l'inhibition de la PKR par la 2-aminopurine, l'inhibition spécifique de la PKC par le bisindolylmaleimide et celle de la p42/44 MAPK par le PD98059 préviennent la diminution du cytochrome P450 total produite par le RS_{TIR}, le HS_{URVI} et l'IL-6 dans les H_{TIR}. Le fait que tous ces inhibiteurs protègent le P450 total suggère que ces kinases font partie d'une même cascade de signalisation plutôt que d'être activées par des voies parallèles. Ces inhibiteurs préviennent seulement partiellement la diminution de l'activité des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 produite par le RS_{TIR}, le HS_{URVI} et l'IL-6. Ces résultats indiquent que les mécanismes conduisant à la diminution du cytochrome P450 total et à la diminution de l'activité des isoformes du P450 pourraient être différents. Ils suggèrent aussi que le RS_{TIR}, le HS_{URVI} et l'IL-6 activent les p42/44 MAPK et la PKC. D'une autre part, la phosphorylation du Erk1/2 induite par le RS_{TIR} est indépendante de la PKC, tandis que le PD98059 l'inhibe de manière dose dépendante. Ces résultats suggèrent que le RS_{TIR} active la PKC dans une voie de signalisation parallèle à celle des p42/44 MAPK ou que l'activation de la PKC survient après la phosphorylation de Erk1/2 dans la même cascade de signalisation. Ces hypothèses sont compatibles avec des voies de signalisation activées par les cytokines IL-6, INF- γ et IL-1 β décrites en détail dans la section 1.4. En réponse à l'IL-6, plusieurs cascades de signalisation sont activées. L'activation du facteur de transcription STAT3 par l'IL-6 implique une phosphorylation

dépendante de la PKC et conduit à une association directe du STAT3 activé avec les facteurs de transcription c-Jun et c-Fos (Schuringa et coll., 2001). Le récepteur de l'IL-6 activé lie aussi la tyrosine phosphatase SHP2. La SHP2 active la cascade Ras/Raf/Erk (Heinrich et coll., 1998). L'INF- γ se lie à son récepteur et active plusieurs voies de signalisations. Ainsi les voies de la p42/44 MAPK et des Jak-STAT sont activées dans les hépatocytes par un mécanisme dépendant de la PKC (Nguyen et coll., 2000, Deb et coll., 2003). L'INF- γ active le NF- κ B par un mécanisme PKR-dépendant (Deb et coll., 2001). L'IL-1 β active quatre cascades de protéines kinases: l'I κ B kinase/NF- κ B, la p42/44 MAPK, la p38 MAPK, et la Stat/JNK (Chen et coll., 2000). Plusieurs études utilisant des souris déficientes en protéine kinases C ont confirmé le rôle majeur joué par la PKC dans la phosphorylation de l'I κ B et dans l'activation subséquente du NF- κ B (Saijo et coll., 2002; Moscat et coll. en 2003). L'activation du NF- κ B conduit à une interaction physique et à une inhibition fonctionnelle réciproque entre l'Ahr et le NF- κ B (Tian et coll. 1999). L'inhibition de l'Ahr par le NF- κ B pourrait expliquer la suppression des CYP1A1/2 par les cytokines.

La diminution du cytochrome P450 total, mesurée par spectrophotométrie, n'est pas accompagnée d'une diminution de l'expression des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6. Pour expliquer cette contradiction apparente, on doit tenir compte du fait que la mesure spectrophotométrique du P450 est basée sur la liaison du monoxyde de carbone au site de liaison de l'oxygène sur l'ion ferrique du groupement hémique. Par conséquent, la mesure spectrophotométrique du P450, tout comme l'activité catalytique des enzymes,

dépendent de la disponibilité du site de liaison de l'oxygène. La mesure quantitative d'une isoforme utilisant des anticorps spécifiques à un certain épitope, est indépendante de l'activité catalytique de l'enzyme et de la disponibilité du site de liaison sur l'ion ferrique. Dans cette étude, seulement les CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 ont fait l'objet d'une immunoquantification. La diminution du cytochrome P450 total après une incubation de quatre heures avec le RS_{TIR}, le HS_{URVI} et l'IL-6 pourrait donc être due à une régulation négative des autres isoformes du cytochrome P450. Cette hypothèse paraît peu plausible si on tient compte de la longue demi-vie des isoformes du cytochrome P450 qui est de plus de 15 heures (Shiraki et Guengerich, 1984). Par ailleurs, le fait que le CYP3A6 représente approximativement 50% du cytochrome P450 total et qu'il ne soit pas modifié par l'incubation avec le RS_{TIR}, le HS_{URVI} et l'IL-6 exclue pratiquement une répercussion de la diminution de la quantité d'isoformes non étudiées dans notre projet sur le cytochrome P450 total.

L'activité des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 a été diminuée par le RS_{TIR}, le HS_{URVI} et l'IL-6 et la présence des inhibiteurs des PTK, PKC, PKR et p42/44 MAPK a contrecarré partiellement cet effet. Plusieurs mécanismes pourraient être envisagés pour expliquer la diminution d'activité des enzymes du cytochrome P450. Premièrement, la phosphorylation directe de l'apoprotéine produit la dénaturation et la perte de l'activité catalytique de l'enzyme et possiblement la conversion du cytochrome P450 en cytochrome P420 (Pyerin et Taniguchi, 1989). Des études *in vitro* ont mis en évidence que les CYP2B1/2, CYP2B4, CYP2C, CYP2E1 et CYP3A1 peuvent être phosphorylés

sur des résidus sérine (Epstein et coll., 1989; Pyerin et coll. 1984; Menez et coll., 1993; Eliasson et coll., 1994). La phosphorylation est spécifique à certaines isoformes du cytochrome P450, les CYP1A1 et CYP1A2 étant moins susceptibles d'être phosphorylés que les autres (Oesch- Bartlomowicz et coll., 1997; Pyerin et coll., 1987).

Deuxièmement, la diminution de l'activité des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 pourrait impliquer le monoxyde d'azote (NO^\bullet). Le monoxyde d'azote, relâché pendant un épisode inflammatoire est une composante importante des mécanismes de défense de l'hôte. Plusieurs études ont suggéré que le NO^\bullet est responsable de la diminution de l'activité catalytique des enzymes du P450 lors d'une réaction inflammatoire (Iber et coll., 1999). Le NO^\bullet est synthétisé à partir de la L-arginine par l'action des NO^\bullet synthases (NOS) en réponse à des stimuli variés. Parmi eux, les cytokines pro-inflammatoires augmentent le niveau de l'ARNm de la NOS inductible (iNOS) et cette augmentation, due à une activation de la transcription, est dose et temps dépendante. Le promoteur du gène de la *iNOS* contient les motifs pour la liaison de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le contrôle, par les cytokines, des certains gènes. Ces facteurs sont le NF- κ B, les éléments de réponse au INF- γ et au TNF. Durant la réaction inflammatoire, le NO^\bullet est produit *in vivo* dans le foie autant par les hépatocytes que par les cellules de Küpffer. *In vitro*, les hépatocytes en culture humains ou de rat augmentent leur production de NO^\bullet en réponse aux cytokines (Donato et coll., 1997). Dans certains modèles d'inflammation, le cytochrome P450 est la cible mais aussi la source de NO^\bullet . Le LPS induit la synthèse du monoxyde d'azote 2 (NOS2) dans les hépatocytes. On a

suggéré que le CYP3A est impliqué dans le métabolisme de N-hydroxyarginine produite par la NOS2 en formant du NO^\bullet . Kuo et coll. (1995), ont montré que l'inhibition du CYP3A dans une culture d'hépatocytes de rat diminue l'effet stimulateur des cytokines et du LPS sur la synthèse de NO^\bullet et de citrulline, sans affecter la production de la N-hydroxyarginine. L'induction du CYP3A par la dexaméthasone augmente la formation de NO^\bullet déclenchée par le LPS et l'inhibition du CYP3A par la troléandomycine diminue cet effet (Fantuzzi et coll., 1995).

L'effet du NO^\bullet sur le cytochrome P450 peut s'exercer par au moins deux mécanismes. En premier, le NO^\bullet a une forte affinité pour les ions métalliques, spécialement pour l'ion de fer qui est présent dans les hémoprotéines avec lequel il forme des complexes nitrosyles stables. Cette propriété explique l'inhibition réversible de l'activité catalytique du cytochrome P450 causée par la présence du NO^\bullet (Morgan et coll., 2001). Le deuxième mécanisme conduit à une inhibition irréversible de l'activité catalytique par la nitration des résidus spécifiques de tyrosine dans la proximité du site actif ou par l'oxydation des thiols des enzymes du cytochrome P450 (Morgan et coll., 2001). Les deux mécanismes sont probablement séquentiels: la liaison au $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ dans un stade précoce et une nitration des résidus tyrosine dans un stade plus tardif (Quaroni et coll., 1996).

L'inactivation du cytochrome P450 par le monoxyde d'azote a été documentée dans des microsomes et des cytochromes P450 purifiés en utilisant des donneurs de NO^\bullet et le peroxytnitrite. Les inhibiteurs de la NOS ont bloqué ou atténué l'effet des stimuli

inflammatoires sur le cytochrome P450 total, quantifiable par spectrophotométrie ainsi que celui sur l'activité catalytique des isoformes du cytochrome P450 autant *in vitro* que *in vivo*. Khatsenko et Kikkawa (1997) ont rapporté que l'administration d'un inhibiteur de la NOS à des rats traités avec du LPS empêche la diminution de l'activité du CYP2B1/2, de son ARNm et de la protéine. Carlson et Billings (1996) ont montré que l'inhibition de la NOS bloque la diminution du CYP2B1/2 par un „cocktail” de cytokines dans une culture d'hépatocytes de rat. Donato et coll., (1997), ont observé que l'INF γ produit une diminution des activités catalytiques des CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 et CYP3A4, une régulation négative des protéines CYP1A2 et CYP3A4 et de l'ARNm du *CYP3A4* dans une culture d'hépatocytes humains et que ces effets sont partiellement contrecarrés par l'inhibition de la synthèse de NO $^{\bullet}$ avec la N $^{\omega}$ monomethyl-L-arginine (L-NAME). Les effets du NO $^{\bullet}$ sur les activités catalytiques et spectrales du cytochrome P450 sont bien documentés mais des résultats contradictoires ont été obtenus concernant le rôle du NO $^{\bullet}$ dans la régulation négative des protéines du P450. Ainsi, Ferrari et collaborateurs (1999) ont montré que la diminution du CYP2B1 par le LPS se produit selon deux mécanismes indépendants: un mécanisme lent pré-translationnel, NO-indépendent, qui survient à des doses faibles ou modérées de LPS, et un mécanisme rapide, dépendant du NO $^{\bullet}$ qui intervient après l'administration des doses fortes de LPS et implique une dégradation accélérée de la protéine. Takemura et ses collaborateurs (1999) ont rapporté que l'étape précoce de l'endotoxémie s'accompagne d'une augmentation de la NOS2 hépatique, d'une augmentation des concentrations plasmatiques des nitrites et nitrates et que le NO $^{\bullet}$ diminue l'activité du cytochrome

P450 hépatique sans affecter la quantité des ARNm ou des protéines du cytochrome P450.

Plusieurs arguments soutiennent l'implication du NO^\bullet dans la réduction de l'activité enzymatique des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 produite par le RS_{TIR} , le HS_{URVI} et l'IL-6. L'activité catalytique du cytochrome P450 dépend de la liaison de l'oxygène au Fe^{2+} pour former le complexe cytochrome P450-dioxygène, nécessaire pour transférer un atome d'oxygène au substrat. Par conséquent, la diminution du cytochrome P450 total sans la diminution dans l'expression de la protéine est compatible avec l'hypothèse que le NO^\bullet se lie au Fe^{2+} , ce qui réduit l'activité catalytique de l'enzyme ainsi que la liaison du monoxyde de carbone nécessaire à la mesure spectrophotométrique. Notre étude démontre de plus qu'un excès de NO^\bullet généré par le nitroprussiate de sodium diminue l'activité des CYP1A1, 1A2 et 3A6. Le RS_{TIR} augmente la production de NO^\bullet et le N^ω -nitro-L-arginine méthylesther (L-NAME) prévient l'augmentation de NO^\bullet , et partiellement, la réduction de l'activité du CYP1A1/2. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont prouvé que le L-NAME prévient *in vivo* la diminution de l'activité du CYP1A1/2 lors d'une réaction inflammatoire induite par l'injection sous-cutanée de la térébenthine (Barakat et coll., 2001). *In vitro*, le L-NAME prévient de façon dose-dépendante la diminution du CYP21A1/2 et du cytochrome P450 total par le RS_{TIR} et le HS_{URVI} (El-Kadi et coll., 2001).

Plusieurs arguments indiquent que le NO[•] et les SOR sont impliqués dans la modulation de l'activité du CYP1A1/2. L'inhibition du NF-κB par l'antioxydant pyrrolidine dithiocarbamate a des effets semblables à ceux du PD98059 et du L-NAME. L'TNF γ augmente la production du NO[•] dans les macrophages par l'induction de la NOS inducible. La cascade biochimique activée implique comme seconds messagers JAK2, MAPK, Erk1/2 et STAT1 (Blanchette et coll., 2003). Le TNF α , augmente l'ARNm et la protéine de la iNOS, la production du NO[•] ainsi que la translocation du facteur NF-κB dans le noyau et la phosphorylation des MAPK. Le PD98059 inhibe l'effet du TNF α sur l'ARNm du *iNOS*. Ces observations suggèrent l'implication du NF-κB et des MAPK dans la régulation du iNOS par le TNF α (Lee et coll., 2003). La p42/44MAPK et les SOR activent la translocation nucléaire du facteur NF-κB et sa liaison au promoteur de la *NOS*, conduisant à une augmentation rapide de l'expression de la NOS et de la production de NO[•] (Cai et coll., 2003). Aussi, d'autres études ont rapporté que les SOR stimulent rapidement la formation du NO[•] par une augmentation du transport intracellulaire d'arginine, impliquant la voie des MAPK (Flores et coll., 2003 ; Wyatt et coll., 2002 ; Pan et coll., 2002). Différents arguments plaident en faveur de l'implication des SOR dans la diminution de l'activité du CYP1A1/2 par le H_{TIR}. Premièrement, les anti-oxydants N-acétylcystéine et diméthylthiourea préviennent de façon dose-dépendante l'effet du RS_{TIR} et du HS_{URVI}. Deuxièmement, *in vitro* l'inhibition de la superoxyde dismutase par la diéthylthiocarbamate, l'inhibition de la glutathione peroxydase par le DL-buthionine-(R,S)-sulfoximine et l'inhibition de la catalase par le 3-

amino-1,2,4-triazole augmentent l'effet des sérums sur l'activité du CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 ainsi que sur le cytochrome P450 total (El-Kadi et coll., 2000). *In vivo*, la diminution du cytochrome P450 est accompagnée par l'augmentation de l'activité de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxidase chez les lapins ayant une réaction inflammatoire aiguë (Proulx et du Souich, 1995).

3.2 Conclusion

Cette étude démontre que le RS_{TIR} , le HS_{URVI} et l'IL-6 diminuent l'activité du CYP1A1, du CYP1A2 et du CYP3A6, dans des hépatocytes provenant de lapins ayant une réaction inflammatoire induite par injection sous-cutanée de térébenthine. Les résultats obtenus indiquent que les voies de signalisation activées impliquent la PTK, la p42/44 MAPK et la PKC. Ces résultats suggèrent de plus que la PKC est activée dans une voie de signalisation parallèle à celle des p42/44 MAPK ou que l'activation de la PKC survienne après la phosphorylation de Erk1/2 dans la même cascade de signalisation. Plusieurs observations suggèrent que le NO^* joue un rôle important dans l'inactivation de ces isoformes bien que la régulation de l'activité du CYP1A1/1A2 soit plus complexe et que plusieurs mécanismes semblent intervenir

4. BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Razzak Z., Corcos L., Fautrel A., Campion J.P., Guillouzo A. Transforming growth factor-beta 1 down-regulates basal and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytochromes P-450 1A1 and 1A2 in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.*, 46(6), 1100-1110, 1994.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Biologie moléculaire de la cellule*, 1994, Médecine-Sciences, Flammarion.

Arrhenius E. Effects on hepatic microsomal N- and C-oxygenation of aromatic amines by in vivo corticosteroid or aminofluorene treatment, diet, or stress. *Cancer Res.*, 28(2), 264-273, 1968.

Azri S. et Renton K.W. Depression of murine hepatic mixed function oxidase during infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243(3), 1089-1094, 1987.

Barakat M.M., El-Kadi A.O., du Souich P. L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction. *Life Sci.* 69(13), 1559-1571, 2001.

Barclay T.B., Peters J.M., Sewer M.B., Ferrari L., Gonzalez F.J., Morgan E.T. Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha dependent, *J Pharmacol. Exp. Ther.* 290(3), 1250-1257, 1999.

Bartlomowicz B., Waxman D.J., Utesch D., Oesch F., Friedberg T.,
Phosphorylation of carcinogen metabolizing enzymes: regulation of the
phosphorylation status of the major phenobarbital inducible cytochromes P-450 in
hepatocytes. *Carcinogenesis*;10, 225-228, 1989.

Batra J.K., Raj H.G., Subramanian T.A. Effect of cord factor, a toxic glycolipid
from *Mycobacterium tuberculosis*, on mouse liver drug metabolizing enzymes.
Toxicon. 25(3), 345-349, 1987.

Beck F.J., Whitehouse M.W. Effect of adjuvant disease in rats on
cyclophosphamide and isophosphamide metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 22(19),
2453-2468, 1973.

Birch H.E., Schreiber G. Transcriptional regulation of plasma protein synthesis
during inflammation. *J. Biol. Chem.*, 261(18), 8077-8080, 1986.

Blackwell T.S. et Christman J.W. The role of the nuclear factor κ B in the
cytokine regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 17, 3-9, 1997.

Blanchette J., Jaramillo M., Olivier M., Signalling events involved in
interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology* 108,
513-522, 2003.

Bleau A.M., Levitchi M.C., Maurice H., du Souich P. Cytochrome P450
inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with
a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br. J. Pharmacol.*, 130(8),
1777-1784, 2000.

Brockmeyer N.H., Barthel B., Mertins L., Goos M. Changes of antipyrine
pharmacokinetics during influenza and after administration of interferon-alpha and -
beta. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 36(6), 309-311, 1998.

Cai H., Li Z., Davis M.E., Kanner W., Harrison D.G., Dudley S.C. Jr, Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol. Pharmacol.* 63, 325-331, 2003.

Calleja C., Bigot K., Eeckhoutte C., Sibille P., Boulard C., Galtier P. Comparison of hepatic and renal drug-metabolising enzyme activities in sheep given single or two-fold challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 30(8), 953-8, 2000.

Calleja C., Eeckhoutte C., Dacasto M., Larrieu G., Dupuy J., Pineau T., Galtier P. Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6 beta-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 56(10), 1279-1285, 1998.

Calleja C., Eeckhoutte C., Larrieu G., Dupuy J., Pineau T., Galtier P. Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239(1), 273-278, 1997.

Carcillo, J.A., Doughty L., Kofos D., Frye R.F., Kaplan S.S., Sasser H., Burckart G.J. Cytochrome P450 mediated-drug metabolism is reduced in children with sepsis-induced multiple organ failure. *Intensive Care Med.* 29, 980-984, 2003.

Carlson T.J. et Billings R.E. Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.*, 49(5), 796-801, 1996.

Chang K.C., Bell T.D., Lawer B.A. Altered theophylline pharmacokinetics during the acute respiratory viral illness. *Lancet*, 1 (8074), 1132-1133, 1978.

Chen C.C., Chen J.J., et Chiu K.T. Protein Kinase C α but not p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase, p38, or c-Jun NH₂-Terminal Kinase Is Required for Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression Mediated by Interleukin-1 β : Involvement of Sequential Activation of Tyrosine Kinase, Nuclear Factor- κ B-Inducing Kinase, and I κ B Kinase 2. *Mol. Pharmacol.* 58(6), 1479-1489, 2000.

Chen C.C., Sun Y.T., Chen J.J., et Chou C.-Y. TNF- α -induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C- γ 2, protein kinase C- α , tyrosine kinase, NF- κ B-inducing kinase, and I- κ B kinase 1/2 pathway, *J Immunol.* 165(5), 2719-2728, 2000.

Chen Y.L., Florentin I., Batt A.M., Ferrari L., Giroud J.P., Chauvelot-Moachon L. Effects of interleukin-6 on cytochrome P450-dependent mixed-function oxidases in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 44(1), 137-148, 1992.

Cheng P.Y., Wang M., Morgan E.T. Rapid transcriptional suppression of rat cytochrome P450 genes by endotoxin treatment and its inhibition by curcumin. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 307(3), 1205-1212, 2003

Coumoul X., Diry M., Barouki R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem. Pharmacol.* 64(10), 1513-1519, 2002.

de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van den Anker J.N. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet.*, 37 (6), 485-505, 1999.

Deb A., Haque S.J., Mogensen T., Silverman R.H., Williams B.R.. RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF- κ B by IFN- γ in a STAT1-independent pathway, *J Immunol.* 166(10), 6170-6180, 2001.

Deb D.K., Sassano A., Lekmine F., Majchrzak B., Verma A., Kambhampati S., Uddin S., Rahman A., Fish E.N., Platanias L.C. Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *Immunol.*, 171(1), 267-273, 2003.

Donato M.T., Guillen M.I., Jover R., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281(1), 484-490, 1997.

Eliasson E., Mkrtchian S., Halpert J.R., Ingelman-Sundberg M., Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1. *J. Biol. Chem.* 269, 18378-18383, 1994.

El-Kadi A.O., Bleau A.M., Dumont I., Maurice H., du Souich P. Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab. Dispos.*, 28(9), 1112-1120, 2000.

El-Kadi A.O., Maurice H., Ong H., du Souich P. Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver. *Br. J. Pharmacol.*, 121(6), 1164-1170, 1997.

Epstein P.M., Curti M., Jansson I., Huang C.K., Schenkman J.B., Phosphorylation of cytochrome P450: regulation by cytochrome b5. *Arch. Biochem. Biophys.*, 271: 424-432, 1994.

Fantuzzi G., Galli G., Zinetti M., Fratelli M. and Ghezzi P.. The upregulating effect of dexamethasone on tumor necrosis factor production is mediated by a nitric oxide-producing cytochrome P450. *Cell. Immunol.* 160, 305–308, 1995.

Fattori E., Cappelletti M., Costa P., Sellitto C., Cantoni L., Carelli M., Faggioni R., Fantuzzi G., Ghezzi P. and Poli V. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 180, 1243-1250, 1994.

Ferrari L., Peng N., Halpert J.R., and Morgan E.T. Role of Nitric Oxide in Down-Regulation of CYP2B1 Protein, but Not RNA, in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 60 (1), 209-216, 2001.

Flores C., Rojas S., Aguayo C., Parodi J., Mann G., Pearson J.D., Casanello P., Sobrevia L. Rapid stimulation of L-arginine transport by D-glucose involves p42/44(MAPK) and nitric oxide in human umbilical vein endothelium. *Circ. Res.* 92, 64-72, 2003.

Fradette C., et du Souich, P., Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression, *Current Drug Metabolism*, 5, 257-271, 2004.

Gabay C., et Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation, *N. Engl. J. Med.*, 340, 448-454, 1999.

George J., Liddle C., Murray M., Byth K., Farrell G.C. Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis, *Biochem. Pharmacol.*, 49(7), 873-881 1995.

Gonzales F.P. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40, 243-288, 1988.

Guengerich, F.P. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P-450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions*, 106, 161-182, 1997.

Hannun, Y.A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* 269, 3125-3128, 1994.

Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, 334, 297-314, 1998.

Iber H., Chen Q., Cheng P.Y., Morgan E.T. Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.*, 377(1), 187-194, 2000.

Iber H., Li-Masters T., Chen Q., Yu S., Morgan E.T. Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting, and inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297(1), 174-180, 2001.

Kato R., Nakamura Y., Chiesara E. Enhanced phenobarbital induction of liver microsomal drug-metabolizing enzymes in mice infected with murine hepatitis virus, *Biochem. Pharmacol.*, 12, 365-370, 1963.

Katzung B.G. *Basic&Clinical Pharmacology*, ed. by B.G. Katzung, 57, Lange Medical Books, pages 51-63, 2001.

Kawaguchi H., Matsui Y., Watanabe Y., Takakura Y. Effect of interferon-gamma on the pharmacokinetics of digoxin, a P-glycoprotein substrate, intravenously injected into the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308(1), 91-96, 2004.

Kobusch A.B., Erill S., du Souich P. Relationship between changes in seromucoid concentrations and the rate of oxidation or acetylation of several substrates. *Drug Metab. Dispos.*, 14(6), 663-667, 1986.

Kozak W., Kluger M.J., Soszynski D., Conn C.A., Rudolph K., Leon L.R., Zheng H. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 47, 856-833, 1998.

Kraemer M.J., Furukawa C.T., Kemp J.R., Shapiro G.G., Pierson W.E., Bierman C.W. Altered theophylline clearance during influenza B outbreak. *Pediatrics*, 69, 476-480, 1982.

Kudo S., Kawano K. Role of interleukin-1beta in the modulations of cytochrome P450 and heme metabolism in rat liver. *J. Interferon Cytokine Res.* 19(6), 601-607, 1999.

Kuo P.C., Abe K.Y., Dafoe D.C. Cytochrome P450III_A activity and cytokine-mediated synthesis of nitric oxide. *Surgery*, 118(2):310-317, 1995.

Lee J.K., Choi S.S., Won J.S., Suh H.W. The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in C6 cells: involvement of AP-1 and NF-kappaB. *Life Sci.* 73: 595-609, 2003.

London S.J., Idle J.R., Daly A.K., Coetzee G.A. Genetic variation of CYP2A6, smoking and risk of cancer, *Lancet*, 353, 898-899, 1999.

Mahu J.L., Feldmann G. Study of biochemical behavior of some exported and nonexported hepatic proteins during an acute inflammatory reaction in the rat, *Enzyme*, 31(4), 234-240, 1984.

Matzke G.R., Frye R.F., Early J.J., Straka R.J., Carson S.W. Evaluation of the influence of diabetes mellitus on antipyrine metabolism and CYP1A2 and CYP2D6 activity. *Pharmacotherapy*, 20(2), 182-190, 2000.

Meibohm B., Beierle I., Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin. Pharmacokinet.*, 41(5), 329-342, 2002.

Menez J.F., Machu T.K., Song B.J., Browning M.D., Deitrich R.A., Phosphorylation of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) by calmodulin dependent protein kinase, protein kinase C and cAMP dependent protein kinase. *Alcohol Alcohol*, 28: 445-51, 1993.

Merril A.H. Jr, Nikolova-Karakashian M., Schmelz E.M., Morgan E.T., Stewart J. Regulation of cytochrome P450 expression by sphingolipids, *Chem. Phys. Lipids*. 102(1-2),131-139, 1999.

Meyer U.A., Zanger U.M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacolo. Toxicol.*, 37, 269-296, 1997.

Morel Y. et Barouki R. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes, *Médecine, Science, Synthèse*, 14, 713-721, 1998.

Morgan E.T. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab. Rev.* 29, 1129-1188, 1997.

Morgan E.T. Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin, *Mol. Pharmacol.* 36(5), 699-707, 1989.

Morgan E.T., Ullrich V., Daiber A., Schmidt P., Takaya N., Shoun H., McGiff J.C., Oyekan A., Hanke C.J., Campbell W.B., Park C.S., Kang J.S., Yi H.G., Cha Y.N., Mansuy D., Boucher J.L. Cytochromes P450 and flavin monooxygenases--targets and sources of nitric oxide, *Drug Metab. Dispos.*, 29(11), 1366-1376, 2001.

Morgan E.T. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab. Dispos.* 29(3), 207-212, 2001.

Moritz K.U., Walter R., Leopold K., Hadasova E., Engel G., Siegmund W., Interferon- and streptolysin O-induced activation of protein kinases and inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases in rats. *Pharmazie*, 53(4), 268-71, 1998.

Moscat J., Diaz-Meco M.T. and Rennert P. NF-kB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. *EMBO reports*, 4, 1, 31-36, 2003.

Nadin L., Butler A.M., Farrell G.C., Murray M. Pretranslational down-regulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology*, 109(1), 198-205, 1995.

Nakajima M., Yamamoto T., Nunoya K-I., Yokoi T., Nagashima K., Inoue K., Funae Y., Shimada N., Kuroiawa Y. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine, *Drug Metab. Dispos.* 24, 1212-1212, 1996.

Nebert D.W., Petersen D.D., Puga A., Human A. Ah locus polymorphism and cancer inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxins, *Pharmacogenetics*, 1, 68-78, 1991.

Nguyen V.A., Chen J., Hong F., Ishac E.J., Gao B. Interferons activate the p42/44 mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator transcription factor) signalling pathways in hepatocytes: differential regulation by acute ethanol via a protein kinase C-dependent mechanism, *Biochem. J.*, 349(Pt 2), 427-434, 2000.

Oesch-Bartlomowicz B., Arens H.J., Richter B., Hengstler J.G., Oesch F., Control of the mutagenicity of aromatic amines by protein kinases and phosphatases. I. The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and ortho-vanadate drastically reduce the mutagenicity of aromatic amines. *Arch. Toxicol.*; 71: 601-611, 1997.

Omura T., Sato R., The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378, 1965.

Ortiz de Montellano, P.R.: Oxygen activation and transfer. In cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry. Ed. by P.R. Ortiz de Montellano, 217-271, Plenum Publishing Corp., New York, 1986.

O'Shea D., Davis S.N., Kim R.B., Wilkinson G.R. Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity *Clin. Pharmacol. Ther.*, 56(4), 359-367, 1994.

Pan M., Meng Q.H., Wolfgang C.L., Lin C.M., Karinch A.M., Vary T.C., Souba W.W. Activation of intestinal arginine transport by protein kinase C is mediated by mitogen-activated protein kinases. *J. Gastrointest. Surg.* 6: 876-82, 2002.

Parent C., Belanger P.M., Jutras L., du Souich P. Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes: alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261(2):780-787, 1992.

Pasanen, M. et Pelkonen O. The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta, *Critical Reviews in Toxicology*, 24, 211-229, 2004.

Pascussi J.M., Gerbal-Chaloin S., Pichard-Garcia L., Daujat M., Fabre J.M., Maurel P., Vilarem M.J. Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(3), 707-713, 2000.

Pichette V. et Leblond F.A. Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr. Drug Metab.* (2), 91-103, 2003.

Piquette-Miller M. et Jamali F. Influence of severity of inflammation on the disposition kinetics of propranolol enantiomers in ketoprofen-treated and untreated adjuvant arthritis, *Drug Metab. Dispos.* 23(2):240-245, 1995.

Proulx M. et du Souich P. Inflammation-induced decrease in hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits is accompanied by an increase in hepatic oxidative stress, *Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol.* 87(2), 221-236, 1985.

Pyerin W., Taniguchi H., Stier A., Oesch F., Wolf C.R., Phosphorylation of rabbit liver cytochrome P-450 LM2 and its effect on monooxygenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 620-626, 1984.

Pyerin W., Taniguchi H., Horn F., Oesch F., Amelizard Z., Friedberg T., Wolf C.R., Isoenzyme-specific phosphorylation of cytochromes P-450 and other drug metabolizing enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142: 885-892, 1987.

Pyerin W. et Taniguchi H. Phosphorylation of hepatic phenobarbital inducible cytochrome P-450, *The EMBO Journal*, 8, 10, 3003-3010, 1989.

Qiang M. and Whitlock J.P. Jr. Novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Biol. Chem.* 272(14):8878-8884, 1997.

Quaroni L., Reglinski J., Wolf R., Smith W.E. Interaction of nitrogen monoxide with cytochrome P-450 monitored by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Biochim Biophys Acta*, 1296(1), 5-8, 1996.

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. Pharmacology (Chapitre: Drug elimination and pharmacokinetics) page: 78

Renton K.W. The deleterious effect of Bordetella pertussis vaccine and poly(rI.rC) on the metabolism and disposition of phenytoin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208(2), 267-270, 1979.

Renton KW. Depression of hepatic cytochrome P-450-dependent mixed function oxidases during infection with encephalomyocarditis virus, *Biochem. Pharmacol.* 30(16), 2333-2336, 1981.

Rivory L.P., Slaviero K.A., Clarke S.J. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response, *Br. J. Cancer.*, 87(3), 277-280, 2002.

Roe A.L., Warren G., Hou G., Howard G., Shedlofsky S.I., Blouin R.A. The effect of high dose endotoxin on CYP3A2 expression in the rat. *Pharm. Res.* 15(10), 1603-1608, 1998.

Saijo K., Mecklenbrauker I., Santana A., Leitger M., Schmedt C., Tarakhovsky A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J. Exp. Med.* 195(12), 1647-52, 2002

Segel I., *Enzymes kinetics*. Ed. J. Wiley and son Inc, 1975.

Shiraki H., Guengerich F.P. Turnover of membrane proteins: kinetics of induction and degradation of seven forms of rat liver microsomal cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydrolase, *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 235(1), 86-96, 1984.

Schuringa J.J., Dekker L.V., Vellenga E., Kruijer W. Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J. Biol. Chem.*, 276(29), 27709-27715, 2001.

Schutze S., Berkovic D., Tomsing O., Unger C., M Kronke. Tumor necrosis factor induces rapid production of 1,2'-diacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.*, 174, 975-988, 1991.

Shedlofsky S.I., Israel B.C., Toleva R., Blouin R.A. Endotoxin depresses hepatic CYP450 mediated drug metabolism in women, *Br. J. Pharmacol.*, 43, 627-632, 1997.

Shou M., Lin Y., Lu P., Tang C., Mei Q., Cui D., Tang W., Ngui J.S., Lin C.C., Singh R., Wong B.K., Yergey J.A., Lin J.H., Pearson P.G., Baillie T.A., Rodrigues A.D., Rushmore T.H. Enzyme kinetics of cytochrome P450-mediated reactions. *Curr. Drug Metab.* 2, 17-36, 2001.

Siewert E., Bort R., Kluge R., Heinrich P.C., Castell J., Jover R. Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology*, 32(1), 49-55, 2000.

Silverman N. et Maniatis T. NF-kB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes and Development*, 15, (18), 2321-2342, 2001

Srivastava P. et Pandey V.C. Studies on hepatic mitochondrial cytochrome P-450 during *Plasmodium yoelii* infection and pyrimethamine treatment in mice, *Ecotoxicol Environ Saf.*, 46(1), 19-22, 2000.

Takahashi-Tezuka M., Yoshida Y., Fukada T., Ohtani T., Yamanaka Y., Nishida K., Nakajima K., Hibi M., Hirano T., Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18(7), 4109-4117, 1998.

Takemura S., Minamiyama Y., Imaoka S., Funae Y., Hirohashi K., Inoue M., Kinoshita H.. Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia, *J. Hepatol.*, 30(6), 1035-1044, 1999.

Tanaka E. Clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions: role of cytochrome P450 enzyme. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 23, 403-416, 1998.

Tapner M., Liddle C., Goodwin B., George J., Farrell G.C. Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology*. 24(2), 367-373, 1996.

Tian Y., Ke S., Denison M.S., Rabson A.B., Gallo M.A. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* 274(1):510-515, 1999.

Van Ess P.J., Mattson M.P., Blouin R.A. Enhanced induction of cytochrome P450 enzymes and CAR binding in TNF (p55(-)/p75(-)) double receptor knockout mice following phenobarbital treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300(3), 824-830, 2002.

Wang Z., Hall S.D., Maya J.F., Li L., Asghar A., Gorski J.C. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 55(1), 77-85, 2003.

Warren G.W., Poloyac S.M., Gary D.S., Mattson M.P., Blouin R.A. Hepatic cytochrome P-450 expression in tumor necrosis factor- α receptor (p55/p75) knockout mice after endotoxin administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288(3):945-950, 1999.

Wiwi C.A. et Waxman D.J. Role of hepatocyte nuclear factors in growth hormone-regulated, sexually dimorphic expression of liver cytochromes P450. *Growth Factors.*, 22(2):79-88, 2004.

Wyatt A.W., Steinert J.R., Wheeler-Jones C.P., Morgan A.J., Sugden D., Pearson J.D., Sobrevia L., Mann G.E Early activation of the p42/p44MAPK pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism. *FASEB J*, 16, 1584-1594, 2002.